



**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**

# **A qualidade da cortiça e a sua relação com a expressão génica no felogénio de *Quercus suber***

**Miguel de Jesus Nunes Ramos**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Biologia Funcional**

Orientadora: Professora Auxiliar Leonor Morais-Cecílio.

Co-Orientadora: Doutora Margarida Rocheta.

Co-Orientador: Professor Auxiliar José Afonso Rodrigues Graça.

## **Júri:**

Presidente: Doutora Sara Barros Queiroz Amâncio, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutor Jorge Alexandre Matos Pinto de Almeida, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Doutora Maria Leonor Mota Morais Cecílio, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Doutor José Afonso Rodrigues Graça, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Doutora Teresa Maria Gonçalves Quilhó Marques dos Santos, Investigadora Auxiliar do Instituto de Investigação Científica Tropical.

Lisboa, 2011

## Agradecimentos

Ao fechar mais uma etapa, é importante olhar para trás e reconhecer todos aqueles que nos ajudaram a chegar ao fim. Assim, é com uma enorme satisfação que apresento os meus mais sinceros agradecimentos...

À professora Leonor Morais-Cecílio, por me aceitar no seu projecto, por saber incutir a dose necessária de *stress* para que o projecto andasse a tempo e horas, por se ter mostrado incansável durante todo o processo de revisões e no todo, por ter partilhado comigo parte do seu conhecimento;

À Doutora Margarida Rocheta, pelas incontáveis vezes que entrou no laboratório comigo para me orientar, ensinar, mas sobretudo apoiar, respondendo prontamente a todas as minhas dúvidas.

Ao professor José Graça, por todo o apoio que prestou, confiando-me parte do seu projecto e partilhando também os seus conhecimentos numa área onde eu estava tão pouco à vontade. Foi, sem sombra de dúvidas, um excelente orientador.

À Luísa Carvalho, por ter sido um pilar fundamental e indispensável na optimização e tratamento de dados do qRT-PCR.

À professora Wanda Viegas e Dra. Teresa Quilhó Santos por me terem acolhido nos laboratórios de genética e análise de imagem, respectivamente.

Ao Lucas pelo apoio prestado na análise estatística e ao Henrique por ter ajudado a quebrar o gelo com o *software* de análise de imagem. Ao Dr. Jorge Paiva, que gentilmente cedeu a sequência do gene *QsMET1*.

A todas as pessoas que constroem a vida dos laboratórios, seja o de genética, o da fisiologia ou de análise de imagem. Sem o ar saudável que se respira dentro de cada um destes laboratórios, o trabalho feito teria sido inúmeras vezes mais difícil. Agradeço as vezes que me fizeram rir, os almoços em conjunto e as ajudas para a programação dos aparelhos utilizados.

Por fim, mas nem por isso menos importante, gostaria de agradecer a todas aquelas pessoas que apesar de não fazerem parte da esfera laboratorial, deram toda a ajuda necessária, nas pequenas e mais insignificantes coisas do dia-a-dia, de forma a deixar-me focado nas minhas tarefas. Assim, um obrigado especial aos meus pais, cujo apoio foi incondicional e incansável ao longo de todos os anos até à data; ao meu irmão e à minha cunhada, pelas vezes que me tiraram de casa para desanuviar; à Ana, pela quantidade de vezes que ouviu as minhas reclamações, dando-me sempre força para continuar e aos meus amigos de longa data, por me distraírem nos jantares que fazemos de tempos a tempos.

Muito obrigado a todos...

## Resumo

O sobreiro (*Quercus suber*) é uma espécie importante para Portugal, principalmente pelo valor económico da cortiça que produz. A cortiça é produzida pelo felogénio. No caso do sobreiro, este tecido meristemático apresenta poucas descontinuidades e tem um pico de actividade na Primavera. Sempre que surgem descontinuidades no felogénio, a cortiça apresentará defeitos, destacando-se os poros e as inclusões madeirentas como os mais comuns e importantes para a indústria da cortiça.

O reconhecimento de que os processos epigenéticos são determinantes para o desenvolvimento vegetal torna importante o seu estudo no felogénio de sobreiro. Com esse intuito estudaram-se as metiltransferases de DNA através do isolamento de sequências de cada uma das classes (MET, DRM e CMT) e de uma proteína associada à MET1 (DMP1). A análise da sua expressão génica foi efectuada em felogénios de árvores produtoras de cortiça de boa e má qualidade após a avaliação da sua qualidade por métodos de análise de imagem.

Os estudos efectuados permitiram mostrar que a metilação *de novo* é a mais representada neste tecido e estabelecer uma correlação entre a expressão dos genes *QsMET2* e *QsDMP1* e as percentagens de defeitos medidos, apontando estes genes como importantes para os processos responsáveis pela qualidade da cortiça.

Palavras-chave: *Quercus suber*; Metiltransferases de DNA; Felogénio; Cortiça; Análise de imagem; PCR quantitativo em tempo real

## Abstract

The cork oak (*Quercus suber*) is an important species in Portugal, mainly due to the economic value of the cork it produces. Cork is produced by phellogen. In cork oaks, this meristematic tissue has few discontinuities and has a peak of activity in the spring. Every phellogen discontinuity will degenerate into cork defects, being pores and nail inclusions the most common and relevant to cork's industry.

Acknowledging that epigenetic processes are critical for plant development, their study in phellogen is essential. For this purpose, DNA methyltransferases were studied, by means of isolating sequences of each of its classes (MET, DRM and CMT) and one protein associated to MET1 (DMP1). The analysis of its gene expression was performed in trees' phellogens of both good and bad cork quality producers, after the evaluation of their quality by image analysis methods.

Studies performed showed *de novo* methylation as the most significant in this tissue and a correlation was established between the QsMET2 and QsDMP1 genes expressions and the defects' coefficient measured, which revealed that these genes are important for the cork's quality processes.

Keywords: *Quercus suber*; DNA methyltransferases; Phellogen; Cork; Image analysis; Quantitative real time PCR.

## Dissertation Summary

The cork oak (*Quercus suber*) produces a cork bark with high economic value, which is harvested for industrial uses. Cork has a unique chemical composition as well as physical properties and it is produced by the phellogen which is a meristematic tissue that is formed as a continuous layer with seasonal activity. When a discontinuity occurs in the cork tissue, a pore or a nail inclusion appears. Good cork barks has few pores with a small diameter and a lower number of nail inclusions, as opposed to the bad cork quality ones.

Developmental processes in plants are highly regulated, mainly by epigenetic processes. The methylation of cytosines in DNA is a ubiquitous epigenetic mark in eukaryotic DNA, involved in the regulation of a diverse range of biological processes, mainly in cell differentiation through the regulation of gene expression. DNA methyltransferases (DNMTs) belong to a family of enzymes responsible for this chemical modification. In plants three DNMTs classes are known, each one with its function or methylation context: (i) the MET (METhyltransferase) class is responsible for the maintenance of methylation in CpG zones, (ii) the DRM (Domain-Rearranged-Methyltransferase) class is associated with *de novo* methylation in any context and (iii) the CMT (ChromoMeThylase) class, found only in plants, is responsible for maintaining the methylation in CpHpG sequences. Several other proteins are also involved in the epigenetic reprogramming, such as the DNA Methyltransferase1-Associated Protein 1 (DMAP1) which forms stable complexes with DNMT1 and histone deacetylases and acts as a co-repressor of gene expression.

In order to understand the mechanisms responsible for controlling the molecular machinery involved in cork production, mostly at the epigenetic levels, it is relevant to study the expression profiles of the enzymes involved in DNA methylation in the phellogen. In this research work, the transcriptional profile of four putative DNA methyltransferase genes from the MET, DRM and CMT classes, and one *DMAP1* in *Q. suber* active phellogen belonging to trees producing good or bad quality cork was studied. Furthermore, some correlations between several physical characteristics responsible for cork quality on the same trees and gene expression profiles were established.

Three cork oak trees potential producers of good quality cork and three producers of bad quality cork were selected. Samples of cork and phellogen were collected from these trees during high phellogen activity to further estimate cork quality on the basis of density and the amount of defects, quantified by image analysis tools, and also to perform a transcriptional analysis of selected genes. The measurement of cork density allowed to form two separated groups of trees: (i) three individuals with the lower average density classified

as good cork quality producers (HL12, HL14 and HL16); and (ii) three trees with the highest average density classified as bad cork quality producers (hl2, hl3 and hl18). The quantification of several parameters such as the defects' percentage, nail inclusions' percentage and porosity's percentage, allowed the reinforcement of these groups, being the nail inclusions' and the defects' percentage considered the most relevant features.

Previously, a search was performed on the cork oak EST library (Cork Oak ESTs consortium), and four EST sequences, referred as DNA methyltransferases, and one as *DMAP1* were selected, identified and characterized through comparisons with sequences deposited in available databases. Search homology with BLASTP algorithm against available databases showed significant similarities between the selected putatively translated sequences and known DNMTs (*MET1* - AAC39355, *MET2* - XP\_002874265, *DRM2* - ABW96890 and *CMT3* - ABW96889) and DNMT1 associated proteins (*DMAP1* - XP\_002515237) with very low e-values. Primers were designed to specifically amplify each sequence and perform quantitative real-time-PCR (qRT-PCR) analysis. Gene expression was analyzed in the six phellogen samples, using qRT-PCR in triplicate reactions performed for each cDNA template with each primer pair.

Previous to quantitative gene expression analysis, the gene expression stability was evaluated through the NormFinder algorithm and accessed in all tree samples. The results revealed that *QsDRM2* was the gene with more stable expression which may suggest that *de novo* methylation has no important impact in cork's quality. The DNMTs and *QsDMAP1* gene expression evaluation showed that *QsDRM2* was the gene with the highest expression, while *QsMET1* has the lowest one (~ 5% the *QsDRM2* value); *QsDMAP1*, *QsCMT3* and *QsMET2* expression vary from 15% to 40% of the reference (*QsDRM2*). The highest expression of *QsDRM2* among the other methyltransferases corroborates the idea that *de novo* methylation is an essential regulation step that takes place during cell plant differentiation.

Furthermore, a correlation between the expression of these genes and good and bad cork quality producers was established. All genes express less in the trees producing good quality cork, when compared with the average expression of the bad cork producers, except for *QsCMT3* and *QsDRM2* genes in the tree HL14.

Moreover, the expression of *QsDMAP1* and *QsMET2* could clearly be related to cork's quality. In particular, a positive correlation between *QsDMAP1* expression and the coefficient of nail inclusions ( $R^2 = 0.6$ ) was found. This gene encodes a protein which has been described in humans as a co-repressor of gene expression, capable of binding with other regulatory proteins such as histone deacetylase which is also a regulate gene expression.

The higher expression tendency of DNMTs in the phellogen of bad cork quality producers leads to the suggestion that gene silencing is higher in the phellogen of these trees. This situation can disrupt the epigenetic balance in these trees promoting the death of cells in the phellogen, which will therefore lead to the development of cork defects.

When contemplated together, these results indicate a coordinated action of several epigenetic marks in the regulation of processes responsible for the cork quality.

# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Abstract.....	iii
Dissertation Summary.....	iv
Lista de Quadros.....	ix
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Abreviaturas .....	x
1. Introdução .....	1
1.1. O Sobreiro .....	1
1.2. Composição e estrutura da cortiça .....	1
1.3. Qualidade da cortiça.....	3
1.3.1. Porosidade .....	3
1.3.2. Inclusões madeirentas.....	4
1.3.3. Calibre.....	4
1.4. Controlo epigenético da expressão génica .....	5
1.4.1. O papel da metilação das citosinas .....	5
1.4.2. Classe MET.....	6
1.4.3. Classe DRM .....	7
1.4.4. Classe CMT .....	8
1.4.5. Proteína associada à DNMT1.....	9
1.5. Objectivos.....	10
2. Materiais e Métodos .....	11
2.1. Amostragem .....	11
2.2. Avaliação da qualidade da cortiça .....	12
2.2.1. Preparação do material .....	12
2.2.2. Avaliação do Teor de Humidade da Cortiça .....	13
2.2.3. Avaliação do calibre da cortiça e do ganho com a cozedura .....	13
2.2.4. Medição da densidade aparente da cortiça .....	14
2.2.5. Cálculo da percentagem de defeitos .....	14
2.3. Obtenção de sequências ESTs de <i>Quercus suber</i> referentes a metiltransferases de DNA: análise <i>in silico</i> .....	15
2.3.1. Análise filogenética das sequências de DNMTs .....	17



2.3.2.	Extracção de RNA total e síntese de cDNA.....	17
2.3.3.	PCR quantitativo em tempo real (qRT PCR) .....	18
3.	Resultados .....	19
3.1.	Caracterização física da cortiça .....	19
3.1.1.	Estudo da densidade da cortiça .....	19
3.1.2.	Estudo das propriedades físicas da cortiça .....	20
3.1.3.	Teor de humidade da cortiça .....	22
3.1.4.	Análise de imagem.....	24
3.2.	Análise da expressão génica no felogénio.....	28
3.2.1.	Genes da família Metiltransferase de DNA (DNMT) e proteínas associadas em sobreiro .....	28
3.2.2.	Análise filogenética das sequências isoladas .....	29
3.2.3.	Avaliação da qualidade da amplificação .....	32
3.2.4.	Análise da estabilidade dos genes em estudo.....	34
3.2.5.	Análise de expressão de genes DNMT .....	34
3.3.	Relação entre a qualidade da cortiça e a expressão génica .....	40
4.	Discussão .....	43
4.1.	Caracterização física da cortiça .....	43
4.2.	Análise da expressão génica no felogénio.....	45
5.	Conclusões e perspectivas futuras.....	48
6.	Referências.....	50
	Anexo I: Sequências utilizadas na análise filogenética.....	54
	Anexo II: Alinhamentos entre os genes de estudo e as referências nas bases de dados .....	56

## Lista de Quadros

<b>Quadro 1:</b> Primers desenhados para qRT-PCR. ....	16
<b>Quadro 2:</b> Redução da densidade da cortiça com o processo de cozedura. ....	20
<b>Quadro 3:</b> Análise do efeito da cozedura nas placas de 30x30 cm. ....	21
<b>Quadro 4:</b> Teor de humidade da cortiça .....	23
<b>Quadro 5:</b> Correspondência entre as sequências dos genes isolados e as bases de dados disponíveis. ....	28

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Observação visual das “calas” de cortiça .....	11
<b>Figura 2:</b> Esquema de cortes .....	12
<b>Figura 3:</b> Resultados da análise da densidade da cortiça. ....	19
<b>Figura 4:</b> Comparação entre os ganhos relativos após cozedura .....	22
<b>Figura 5:</b> Evolução do peso das tiras de cortiça no controlo da humidade .....	23
<b>Figura 6:</b> Selecção de defeitos com o <i>software</i> de análise de imagem. ....	24
<b>Figura 7:</b> Percentagem média de defeitos nas amostras de cortiça. ....	25
<b>Figura 8:</b> Comparação da percentagem de defeitos nas amostras de cortiça .....	27
<b>Figura 9:</b> Relações filogenéticas entre as sequências em estudo e sequências homólogas. ....	30
<b>Figura 10:</b> Estudo da caracterização genómica das sequências amplificadas. ....	31
<b>Figura 11:</b> RNA total extraído das amostras de felogénio. ....	32
<b>Figura 12:</b> Curva de <i>melting</i> resultante da amplificação dos diferentes genes .....	33
<b>Figura 13:</b> Valores de estabilidade dos diferentes genes estudados .....	34
<b>Figura 14:</b> Expressão média relativa de cada gene estudado. ....	35
<b>Figura 15:</b> Análise comparativa da expressão dos genes em estudo (usando como referência a amostra hl3). ....	37
<b>Figura 16:</b> Análise comparativa da expressão dos genes em estudo (usando como referência a média das amostras hl). ....	39
<b>Figura 17:</b> Coeficiente de relação entre os diferentes resultados referentes à qualidade da cortiça .....	40
<b>Figura 18:</b> Coeficiente de relação entre a expressão do gene <i>QsMET1</i> e dos genes <i>QsDMP1</i> e <i>QsMET2</i> . ....	41
<b>Figura 19:</b> Relação entre a expressão dos genes de interesse e as diferentes análises de qualidade da cortiça .....	42

## Lista de Abreviaturas

μl – micro litro

BLAST – *Basic local alignment search tool*

cm – centímetro

CMT – CromoMetilTransferase

Ct – *threshold cycle*

DMAP1 – *Dnmt1-Associated Protein 1*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNMTs – *DNA Methyltransferases*

DRM – *Domains Rearranged Methyltransferases*

dsRNA – *double strand RNA*

EST – *Expressed sequence tag*

g – grama

HAT – *Histone acetyltransferase*

HDAC – *Histone deacetylase*

k – quilo

MET – Metiltransferases

mg – miligrama

mm – milímetro

mM – milimolar

MMTR – *MAT1-mediated transcriptional Repressor*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NLS – *Nucleolar localization signal*

NuA4 – *for nucleosome acetyltransferase*

°C – Graus Celsius

pb – pares de base

PCR – Reacção em cadeia da polimerase

qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real

RdDM – *RNA directed DNA methylation*

RFD – *Replication foci domain*

RNA – Ácido ribonucleico

SAM – *S-adenosyl-L-methionine*

siRNA – *small interference RNA*

T<sub>m</sub> – Temperatura de *melting*

UBA – Domínio de ligação à ubiquitina

# 1. Introdução

## 1.1. O Sobreiro

O sobreiro (*Quercus suber*) é uma das mais importantes espécies florestais na Península Ibérica, de onde se pensa ser originário (Lumaret *et al.*, 2005), tendo porém uma larga distribuição em todo o sul da Europa e norte de África (Lumaret *et al.*, 2005; Pereira, 2007). A sua importância deve-se não só ao seu impacto ecológico e social, mas sobretudo dado o valor económico da cortiça que produz (Leal *et al.*, 2006). Ainda assim, estando adaptado a solos de baixa fertilidade (Natividade, 1950), o sobreiro tem um papel ecológico fundamental no combate contra a desertificação e erosão de solos, contribuindo ainda para a manutenção da biodiversidade nestas áreas (Pereira, 2007).

A produção de cortiça ocorre de forma natural no sobreiro e tem como função biológica a protecção da árvore contra condições adversas, sendo particularmente eficaz em fogos florestais (Pereira, 2007; Ricardo *et al.*, 2011), controlo das perdas de água (Soler *et al.*, 2008) e no isolamento de feridas expostas, constituindo uma barreira física que separa o meio exterior dos tecidos vivos (Pereira, 2007).

Relativamente a outras árvores produtoras de cortiça, o sobreiro tem a particularidade de manter o felogénio activo durante anos sucessivos, o que permite boas taxas de crescimento da periderme (Natividade, 1950; Pereira, 2007) e contribui para uma larga utilização industrial sustentável da cortiça produzida (Pereira, 2007). Tendo em conta as suas características, nomeadamente a descontinuidade do tecido, a cortiça é considerada um material único (Ricardo *et al.*, 2011), não sendo ainda conhecido nenhum outro que a possa substituir em termos industriais, o que contribuiu para o seu elevado valor económico.

## 1.2. Composição e estrutura da cortiça

Para fins industriais, a cortiça pode ser extraída de sobreiros a partir dos seus 25-30 anos e ser continuamente colhida durante décadas, dada a sua capacidade de regeneração sustentável, sem consequência aparente para a árvore (Natividade, 1950; Pereira, 2007). Apesar da sua rápida regeneração, o tempo mínimo legal entre colheitas sucessivas à mesma árvore está estipulado em 9 anos (segundo o decreto de lei n.º 169/2001 de 25 de Maio). Das aplicações industriais mais relevantes, nas quais a cortiça é fundamental, destacam-se as produções de rolhas para garrafas de vinho e de materiais isolantes (Graça & Pereira, 2004; Şen *et al.*, 2011).

O felogénio é um tecido meristemático com actividade sazonal que leva à formação da cortiça (Pereira, 2007; Şen *et al.*, 2011; Soler *et al.*, 2008). Este tecido meristemático é composto por apenas uma camada de células, geralmente sem descontinuidades (Pereira, 2007). As descontinuidades mais comuns ocorrem com a formação de um tipo particular de células, conhecidas como lentículas (Pereira, 2007) e serão apresentadas em pormenor, no decurso desta introdução.

A cortiça, ou felema, desenvolve-se imediatamente abaixo da epiderme (Graça & Pereira, 2004) e é formada como parte da periderme (Pereira, 2007; Şen *et al.*, 2011; Soler *et al.*, 2008). As células constituintes da cortiça são pequenas e com paredes finas (Graça & Pereira, 2004; Pereira, 2007), crescendo, em comprimento, na direcção radial (Pereira, 2007). Estas células têm forma de prismas hexagonais, ligadas pela base, formando linhas regulares (Pereira, 2007).

Os constituintes químicos da cortiça estão localizados nas paredes das células do tecido suberoso (Pereira, 2007). O principal componente da cortiça é a suberina, que constitui aproximadamente 50% do tecido (Pereira, 2007; Ricardo *et al.*, 2011) e é o constituinte que mais determina as suas propriedades físicas (Ricardo *et al.*, 2011). A suberina é constituída por monómeros lineares de cadeia longa (de 16 a 26 carbonos) de ácidos e álcoois gordos bi-funcionais e glicerol (Pereira, 2007; Ricardo *et al.*, 2011). Os monómeros ligam-se entre si por ligações éster entre os grupos carboxilo e hidroxilo (Pereira, 2007).

A lenhina é o segundo constituinte mais importante da cortiça (20-25%) e corresponde a um polímero aromático (Pereira, 2007; Ricardo *et al.*, 2011). A lenhina é o constituinte que confere rigidez à parede celular, o que lhe permite resistir à compressão (Pereira, 2007).

Por fim, e destacando apenas os constituintes mais relevantes, a cortiça compreende uma fatia de polissacáridos (cerca de 20%) que se dividem entre celulosas e hemicelulosas (Pereira, 2007; Ricardo *et al.*, 2011).

Em linguagem corrente, chama-se barriga à parte da cortiça que, na árvore, se encontra voltada para o interior. Em oposição, a costa será a face da cortiça voltada para o exterior da árvore, caracterizada por ser mais dura e escura que a cortiça propriamente dita (Pereira, 2007).

### **1.3. Qualidade da cortiça**

A qualidade da cortiça produzida é determinante para a aplicação que lhe poderá ser dada e para o seu valor comercial (Fortes *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 1996; Pereira, 2007). A qualidade da cortiça relaciona-se sobretudo com a homogeneidade e continuidade do tecido suberoso, sendo que os defeitos poderão surgir de forma natural (como a formação de poros ou de inclusões madeirentas) ou serem provocados por factores externos (como a resposta a organismos invasores ou mesmo devido a extracções incorrectas) (Fortes *et al.*, 2004; Pereira, 2007).

Uma cortiça é considerada de boa qualidade para fins industriais quando apresenta poros de pequeno diâmetro e uma baixa razão de inclusões madeirentas, em oposição à cortiça de má qualidade, onde a razão de defeitos relativamente à área total é muito elevada (Fortes *et al.*, 2004).

#### **1.3.1. Porosidade**

A porosidade é uma das características que mais tem sido utilizada na qualificação da cortiça (Pereira *et al.*, 1996). Porém, está presente em todas as cortiças, pelo que, em termos objectivos, não deve ser considerado um defeito, mas sim uma característica indesejável (Fortes *et al.*, 2004).

Os poros, aproximadamente cilíndricos, atravessam toda a cortiça no plano radial (Graça & Pereira, 2004; Fortes *et al.*, 2004; Pereira, 2007) e são constituídos por aglomerados de células conhecidas como lentículas (Graça & Pereira, 2004; Pereira *et al.*, 1996; Pereira, 2007). As lentículas são constituídas por tecido de enchimento que, ao desagregar-se, origina os canais lenticulares ou poros (Graça & Pereira, 2004; Pereira, 2007). Este tecido apresenta diversos espaços intercelulares (Fortes *et al.*, 2004; Pereira, 2007), uma vez que as lentículas não têm um arranjo estruturado (Pereira, 2007).

As lentículas resultam da actividade meristemática da felogene lenticular, um tecido meristemático que se diferencia a partir do felogénio na zona da barriga (Fortes *et al.*, 2004; Pereira, 2007). Uma vez que as lentículas se formam sobrepostas a grupos de estomas, pensa-se que os poros podem ter a função de permitir a passagem dos gases necessários para o metabolismo da árvore (Pereira, 2007).

Dadas as diferenças entre a coloração do tecido de enchimento e do tecido suberoso, podem ser utilizadas técnicas de análise de imagem para medir a área dos poros

e assim quantificar a percentagem de porosidade que corresponderá à área total dos poros relativo à área total da cortiça.

### **1.3.2. Inclusões madeirentas**

De entre os defeitos mais determinantes para a qualidade da cortiça estão as inclusões madeirentas ou lenhosas, especialmente quando se encontram em posição tangencial relativamente aos anéis de crescimento da cortiça (Gonzalez-Andrados & Pereira, 1996). Este defeito caracteriza-se por aglomerados de células esclerificadas com paredes grossas e praticamente sem lúmen (Pereira, 2007).

A origem destas inclusões deve-se à morte de pequenas porções de células do felogénio, formando-se interiormente, no floema secundário, uma nova camada deste tecido meristemático e isolando assim as inclusões na cortiça (Pereira, 2007).

As inclusões madeirentas são mais densas do que o tecido suberoso, mais escuras e essencialmente mais duras, e não têm nenhuma aplicação prática a nível industrial (Pereira, 2007). Dado todo este contraste, as inclusões podem ser também facilmente medidas através de técnicas de análise de imagem.

### **1.3.3. Calibre**

O calibre ou espessura da cortiça é um factor dependente da actividade meristemática do felogénio, actividade que está por sua vez relacionada, para além de eventuais factores genéticos, com a temperatura e precipitação que se verificaram nos anos anteriores à colheita, sendo favorecida por Invernos amenos e chuvosos (Fortes *et al.*, 2004; Pereira, 2007).

O felogénio encontra-se activo sobretudo nos meses mais quentes, de Abril a Novembro, com actividade máxima em Junho (Pereira, 2007). Durante todo o Inverno, o tecido não apresenta qualquer actividade meristemática (Pereira, 2007; Soler *et al.*, 2008). Este crescimento sazonal leva à formação de linhas de crescimento, muitas vezes visíveis a olho nu, onde o crescimento de Primavera imprime uma tonalidade mais clara do que o crescimento de Outono, uma vez que é constituído por células com paredes mais espessas (Pereira, 2007; Soler *et al.*, 2008).



## **1.4. Controlo epigenético da expressão génica**

### **1.4.1. O papel da metilação das citosinas**

A metilação do DNA actua em conjunto com outros mecanismos, como a desacetilação e acetilação das histonas e a remodelação da cromatina, de forma a controlar a expressão génica (Huang *et al.*, 2010). A metilação do DNA é um dos factores mais importantes de regulação da expressão génica (Cao *et al.*, 2000; Finnegan & Kovac, 2000; Wada, 2005), levando à condensação da cromatina e assim ao silenciamento génico (Wada, 2005), sem alterar a sequência do DNA (Henderson & Jacobsen, 2007). Esta é a única marca epigenética que se pode transmitir através da mitose e meiose (Gehring *et al.*, 2008; Goll & Bestor, 2005), podendo as alterações nos padrões de metilação de algumas sequências ser transmitidas ao longo de várias gerações, tanto em animais como em plantas (Youngson & Whitelaw, 2008).

A metilação ocorre sobretudo em regiões teloméricas, centroméricas (Bauer & Fischer, 2011; Lister *et al.*, 2009), zonas repetitivas e transposões (Bauer & Fischer, 2011), sendo mesmo a marca de silenciamento mais importante para reprimir a actividade dos elementos transponíveis (Goll & Bestor, 2005). Na regulação da expressão génica, a metilação ocorre principalmente na zona do promotor, sendo esta funcionalmente mais relevante do que a metilação em outras regiões do gene (Goll & Bestor, 2005; Holliday & Pugh, 1995). Por exemplo, Lister *et al.* (2009) revelaram diferenças no perfil de metilação de alguns genes entre dois tipos de células humanas, o que mostra a versatilidade deste processo, de forma a garantir o silenciamento génico adequado para cada tipo celular.

A metilação do DNA é mantida a cada ciclo de replicação através das metiltransferases de manutenção (Henderson & Jacobsen, 2007) que têm uma preferência por estruturas hemi-metiladas. Assim, são atraídas para os locais onde está ocorrer a replicação e, portanto, onde apenas uma das cadeias está metilada, conseguindo actuar na nova cadeia e copiar a marca epigenética da cadeia original (Finnegan & Kovac, 2000). A metilação de manutenção ocorre apenas em domínios simétricos (Law & Jacobsen, 2010). Entre os domínios CpG e CpHpG, ambos simétricos, nota-se uma diferença de estabilidade da metilação, sendo necessária uma metilação activa e continua em locais CpHpG, que não é necessária no caso das zonas CpG (Henderson & Jacobsen, 2007).

A transmissão da metilação, aquando a replicação do DNA, em contextos não simétricos, tem de ocorrer obrigatoriamente através de enzimas que façam a metilação *de novo* (Finnegan & Kovac, 2000; Law & Jacobsen, 2010), associadas a um complexo dependente de RNA (Law & Jacobsen, 2010). Ainda assim, a metilação *de novo* pode

ocorrer mesmo em contextos simétricos, sendo que nestes casos será mantida, em replicações subsequentes, como metilação de manutenção (Sharma *et al.*, 2009). Resumidamente, a metilação *de novo* ocorre sempre em locais não metilados (Sharma *et al.*, 2009) e tem um papel fundamental na regulação génica (Cao *et al.*, 2000), independentemente da replicação do DNA.

Apesar do silenciamento de genes por metilação da citosina no carbono 5 ser uma marca estável, o processo pode ser revertido durante o desenvolvimento das plantas (Law & Jacobsen, 2010), para o que se torna necessário a remoção desta marca epigenética. A metilação do DNA pode ser eliminada (Gehring *et al.*, 2008; Morales-Ruiz *et al.*, 2006) de um modo passivo no momento da replicação do DNA, quando as metiltransferases de manutenção estão inibidas, ou activa (Bauer & Fischer, 2011; Gehring *et al.*, 2008), através de processos específicos para a remoção do grupo metilo (Bauer & Fischer, 2011; Gehring *et al.*, 2008). Dentro dos processos activos, as glicosilases de DNA, muitas vezes associadas à reparação do DNA, têm um papel fundamental, dado que reconhecem e removem a citosina metilada, o que leva à sua substituição por uma nova citosina (Gehring *et al.*, 2008; Morales-Ruiz *et al.*, 2006).

A metilação das citosinas no carbono 5 é efectuada por uma família de enzimas conhecida como DNMTs (DNA Methyltransferases) que catalisam a reacção que transfere um grupo metilo do co-factor S-adenosyl-L-methionine (SAM), também designado por AdoMet (Cao *et al.*, 2000; Finnegan & Kovac, 2000; Genger *et al.*, 1999) para o carbono 5 de uma citosina (Cao *et al.*, 2000; Finnegan & Dennis, 1993; Wyatt, 1951). Nas plantas, existem três classes distintas de metiltransferases de DNA (Finnegan & Kovac, 2000), apresentando não só metilação em contextos CpG, como os animais, mas também em CpNpG e CpHpH (Berger, 2007; Wada, 2005). Em seguida, descreve-se em detalhe cada uma das três classes de DNMTs: METiltransferases (MET), Domains Rearranged Methyltransferases (DRM) e CromoMetilTransferases (CMT).

#### **1.4.2. Classe MET**

As METiltransferases (MET) são responsáveis pela metilação de manutenção em zonas CpG e são as mais abundantes e melhor estudadas (Genger *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2010). As regiões metiladas por estas enzimas são as que apresentam maior taxa de metilação, quando comparadas com as regiões metiladas por outras classes (Lister *et al.*, 2008).

As enzimas MET possuem os oito domínios das DNMTs (I, II, IV, VI, VII, VIII, IX e X) (Finnegan & Dennis, 1993). Destes oito domínios, destacam-se o domínio I, responsável pela ligação ao SAM, o domínio IV, como o centro activo da enzima e o domínio IX, como o local de ligação ao DNA (Finnegan & Dennis, 1993). Esta classe revela ainda um domínio rico em ácido glutâmico e o domínio NLS (*nuclear localization signal*), não presentes nas enzimas homólogas de mamíferos, cuja função deverá ser conduzir a enzima para a forquilha de replicação, aquando da síntese do DNA (Finnegan & Dennis, 1993), onde é necessária a sua acção para a metilação de manutenção.

Em *Arabidopsis thaliana* são conhecidos quatro genes desta classe, destacando-se o gene *MET1*, homólogo ao gene *Dnmt1* de mamíferos (Finnegan & Dennis, 1993; Huang *et al.*, 2010). Os diversos estudos efectuados com mutantes *met1* sugerem que este gene é indispensável na regulação da expressão génica e no desenvolvimento normal das plantas (Wada, 2005), pois os seus mutantes apresentam, por exemplo, folhas mais pequenas e com as margens enroladas, diminuição da fertilidade e redução da dominância apical (Finnegan *et al.*, 1996). Destacam-se ainda os estudos de Jones *et al.* (2001) que, através do silenciamento pos-transcricional do gene *MET1*, demonstraram a importância deste para a metilação de manutenção e para o silenciamento de transgenes, dado que foi observada uma redução significativa da metilação, nas plantas mutantes.

Finnegan *et al.* (1996) revelaram que o silenciamento do gene *MET1* leva a uma redução severa da metilação em contextos CpG, confirmando-se a sua função, mas uma vez que ainda se detecta alguma metilação nestes contextos, propôs-se a presença de outros genes homólogos. De facto para além do gene *MET1*, são encontrados outros genes com elevada similaridade, resultantes de processos evolutivos de duplicação génica (Finnegan & Kovac, 2000) como o gene *MET2* que possui 76% de identidade com *MET1* e é resultante de uma recente duplicação de genes nesta classe (Genger *et al.*, 1999).

Segundo Cao & Jacobsen (2002b) a metilação em CpG pela *MET1* leva a uma sinalização para que outros contextos sejam metilados. A variação da expressão de *MET1-2* em arroz (*Oryza sativa*) mostra uma expressão moderada a elevada desde a floração até à formação da semente (Sharma *et al.*, 2009).

### 1.4.3. Classe DRM

As *Domains Rearranged Methyltransferases* (DRM) possuem os domínios catalíticos típicos das enzimas responsáveis pela metilação *de novo* das citosinas presentes em todos os contextos (Cao *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2010), não sendo conhecida a sua acção na

metilação de manutenção (Cao & Jacobsen, 2002a). As DRM possuem os oito domínios catalíticos das DNMTs, mas com um rearranjo próprio (VI, IX, X, I, II, III, IV e V), diferente das outras classes e das suas homologas em mamíferos (Cao *et al.*, 2000). Estas enzimas apresentam ainda dois a três domínios de ligação à ubiquitina (UBA1-3) (Cao *et al.*, 2000).

Em *Arabidopsis* são conhecidos pelo menos dois genes desta classe (*DRM1* e *DRM2*), resultantes de um processo de duplicação génica (Cao & Jacobsen, 2002a). Homologias encontradas por Cao *et al.* (2000), entre o gene *DRM2* e outros genes de referências, mostram que este é um gene funcional. Preuss *et al.* (2008) mostraram ainda que o gene *DRM2* é necessário para a metilação dos genes ribossomais, em oposição ao gene *DRM1*, que terá um papel secundário. Caso estas enzimas sejam inactivadas, a metilação *de novo* não ocorre e portanto não será possível transmitir a metilação entre gerações, em contextos não simétricos (Finnegan & Kovac, 2000). Uma vez que se tratam de enzimas que promovem a metilação *de novo*, as DRM terão de ser conduzidas até às sequências-alvo, de forma a metilá-las (Finnegan & Kovac, 2000). Assim, a *DRM2* é levada para o local da metilação através de moléculas de small interference RNA (siRNA) num processo de metilação do DNA direccionada por RNA (RdDM – RNA-directed DNA methylation) (Bauer & Fische, 2011; Borges *et al.*, 2008; Goll & Bestor, 2005). Os dsRNAs (double-strands RNA) envolvidos na interacção com a *DRM2* são normalmente complementares de sequências na zona do promotor (Jones *et al.*, 2001), mas podem-se estender, em ambas as cadeias até aproximadamente 3 kpb na região intergénica (Preuss *et al.*, 2008).

O gene *DRM2* apresenta os domínios de ligação à ubiquitina (UBA), levando a considerar uma ligação entre a metilação do DNA e as vias de degradação proteica, através da ubiquitina (Cao *et al.*, 2000). Uma das hipóteses avançadas por Cao *et al.* (2000) é que a ubiquitina poderá fazer variar a localização da *DRM2*, de forma a responder aos sinais externos, ao ciclo celular e à presença de transposões e retrovírus. Este gene em *A. thaliana* mostra uma quebra de expressão na floração e em sementes maduras (Sharma *et al.*, 2009).

#### **1.4.4. Classe CMT**

As CromoMetilTransferases (CMT) são o grupo de DNMTs existentes exclusivamente em plantas (Genger *et al.*, 1999; Goll & Bestor, 2005), responsáveis pela metilação de manutenção em contextos simétricos não CpG (Cao & Jacobsen, 2002b; Huang *et al.*, 2010). As CMT têm um total de oito domínios catalíticos, homólogos a mamíferos (I, II, IV, VI, VII, VIII, IX e X) (Genger *et al.*, 1999). Esta classe possui ainda um

cromodomínio, responsável pela ligação à cromatina (Genger *et al.*, 1999), localizado entre os domínios catalíticos II e IV.

São conhecidos três genes desta classe em *Arabidopsis*: *CMT1*, *CMT2* e *CMT3* (Wada, 2005). O gene *CMT3* foi descrito por Cao & Jacobsen (2002b) e Lindroth *et al.* (2001) como o responsável pela metilação em CpNpG, revelando-o como gene fundamental para a metilação de manutenção em retrotransposições (Huang *et al.* 2010). A enzima CMT3 tem ainda a capacidade de interagir directamente com porções de heterocromatina (Cao & Jacobsen, 2002b; Genger *et al.*, 1999; Wada, 2005) através do seu cromodomínio, ligando-se à histona H3 quando metilada nas posições 9 e 27 (Cao & Jacobsen, 2002b; Wada, 2005), metilação esta associada ao silenciamento génico (Lindroth *et al.*, 2004). Pensa-se, assim, que a enzima CMT3 poderá metilar o DNA, após reconhecer outras alterações epigenéticas a nível da heterocromatina (Genger *et al.*, 1999; Lindroth *et al.*, 2004; Wada, 2005), o que comprova a relação estreita e altamente específica entre as CMT e os padrões da cromatina (Lindroth *et al.*, 2004). No entanto, a enzima CMT3 não deverá ser recrutada para os locais onde irá actuar, apenas pela metilação das histonas, mas também através do envolvimento de siRNAs, que deverão conduzi-la à sequência-alvo (Lindroth *et al.*, 2004).

Durante o ciclo de vida de *A. thaliana*, a expressão de *CMT3* baixa durante a formação da semente (Sharma *et al.*, 2009).

#### **1.4.5. Proteína associada à DNMT1**

Associadas à metilação do DNA, existem ainda outras proteínas cuja função é auxiliar a acção das metiltransferases. A *DnMt1-Associated Protein 1* (DMAP1) co-localiza-se com a enzima Dnmt1 (homóloga à proteína MET1 de plantas em mamíferos) na forquilha de replicação, durante a fase S do ciclo celular, coadjuvando a MET1 na manutenção da metilação, sendo-lhe reconhecida uma actividade repressiva intrínseca (Rountree *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2010).

Rountree *et al.* (2000) isolaram a proteína DMAP1, confirmando-a como co-repressora da expressão génica ao provar que esta se liga aos primeiros 120 aminoácidos da metiltransferase Dnmt1 fazendo pois parte de um complexo repressor da transcrição, juntamente com a enzima HDAC responsável pela desacetilação de histonas. Este co-factor poderá, também, ajudar a Dnmt1 na manutenção da metilação, dado que deverá reconhecer marcas de repressão na estrutura da cromatina (Rountree *et al.*, 2000). Adicionalmente, corroborou-se a contribuição de *DMAP1* no controlo do ciclo celular (Shin *et al.*, 2010), uma vez que *MAT1-Mediated Transcriptional Repressor* (*MMTR*) de rato, que apresenta grande

homologia com *DMAP1*, codifica para uma proteína envolvida na regulação do ciclo celular, através da supressão da transição entre as fases G1/S e G2/M (Shin *et al.*, 2010). Uma outra função desta proteína foi descrita por Negishi *et al.* (2009) que demonstraram que, através da mutação deste gene, se verificava um aumento da instabilidade dos cromossomas em rato. O mesmo estudo verificou que a redução da expressão de *DMAP1*, leva a uma reparação do DNA menos eficaz, o que sugere que a DMAP1 poderá ter acção na reparação deste ácido nucleico. Esta proteína foi ainda descrita como correspondendo a um dos domínios da subunidade NuA4 (for *Nucleosome Acetyltransferase of H4*) do complexo HAT (*histone acetyltransferase*), responsável pela acetilação das histonas H4 e H2A, mas também pela reparação do DNA (Doyon *et al.*, 2004). Esta subunidade é essencial para o controlo do ciclo celular e a sua presença é independente da expressão de *MET1* (Doyon *et al.*, 2004).

## 1.5. Objectivos

Este trabalho teve como objectivo avaliar a expressão de diversas metiltransferases de DNA em felogénios activos e correlacioná-las com a qualidade da cortiça produzida pelas mesmas árvores. Numa fase inicial, foi avaliada a qualidade da cortiça colhida, dando-se ênfase às técnicas de análise de imagem, que permitiram distinguir e quantificar os diferentes defeitos que se encontram na cortiça (poros e inclusões madeirentas).

Numa segunda fase, foram caracterizados genes de metiltransferases de DNA previamente obtidos a partir de bibliotecas de cDNA pirosequenciadas, tendo como referência as bases de dados disponíveis.

Por fim, foi avaliada a expressão dos genes escolhidos, de forma a verificar possíveis variações da sua expressão em felogénios de árvores produtoras de cortiça de boa e má qualidade.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Amostragem

A amostragem foi realizada na Herdade dos Leitões (Ponte de Sor, Portalegre) a 4 e 5 de Junho de 2010 no âmbito dos Projectos “Alterações genéticas e epigenéticas associadas à qualidade da cortiça” (Projecto FCT PTDC/AGR-GFL/104197/2008) e “Genómica da formação da cortiça: um estudo integrado da qualidade da cortiça” (Projecto FCT PTDC/AGR-GPL/101785/2008).

Para este trabalho, foram seleccionadas seis árvores de *Quercus suber*, após extracção de pequenas amostras de cortiça (“calas”) e observação visual da sua qualidade (figura 1). Três destas árvores foram consideradas potenciais produtoras de boa cortiça (referências HL12, HL14 e HL16) e as restantes três produtoras de cortiça de qualidade inferior (hl2, hl3 e hl18). De todas as árvores, foram extraídas amostras de cortiça e de algumas pranchas, contíguas às anteriores, foi imediatamente raspada a superfície interna correspondente ao felogénio e algumas células suberosas em diferenciação. O material raspado foi imediatamente congelado e conservado em azoto líquido para posterior análise genómica. As pranchas de cortiça colhidas foram guardadas à temperatura ambiente para análise da qualidade da cortiça.



Figura 1: Observação visual das “calas” de cortiça para estimar quais as árvores produtoras de boa cortiça e quais as produtoras de cortiça de má qualidade.

## 2.2. Avaliação da qualidade da cortiça

### 2.2.1. Preparação do material

Para avaliar quantitativamente a qualidade da cortiça produzida pelos sobreiros previamente escolhidos, foram cortadas duas placas de cortiça de aproximadamente 30x30 cm, a partir da prancha de cortiça amostrada em cada árvore, com exceção para a árvore HL14 que, por questões de quantidade recolhida, apenas permitiu a obtenção de uma placa (figura 2 - 1º corte). O nome de cada uma das placas foi dado de acordo com a árvore originária e a posição relativa na árvore: para a mesma árvore, a placa 1 corresponderá sempre a uma posição superior relativamente à placa 2, independentemente das distâncias ao solo.

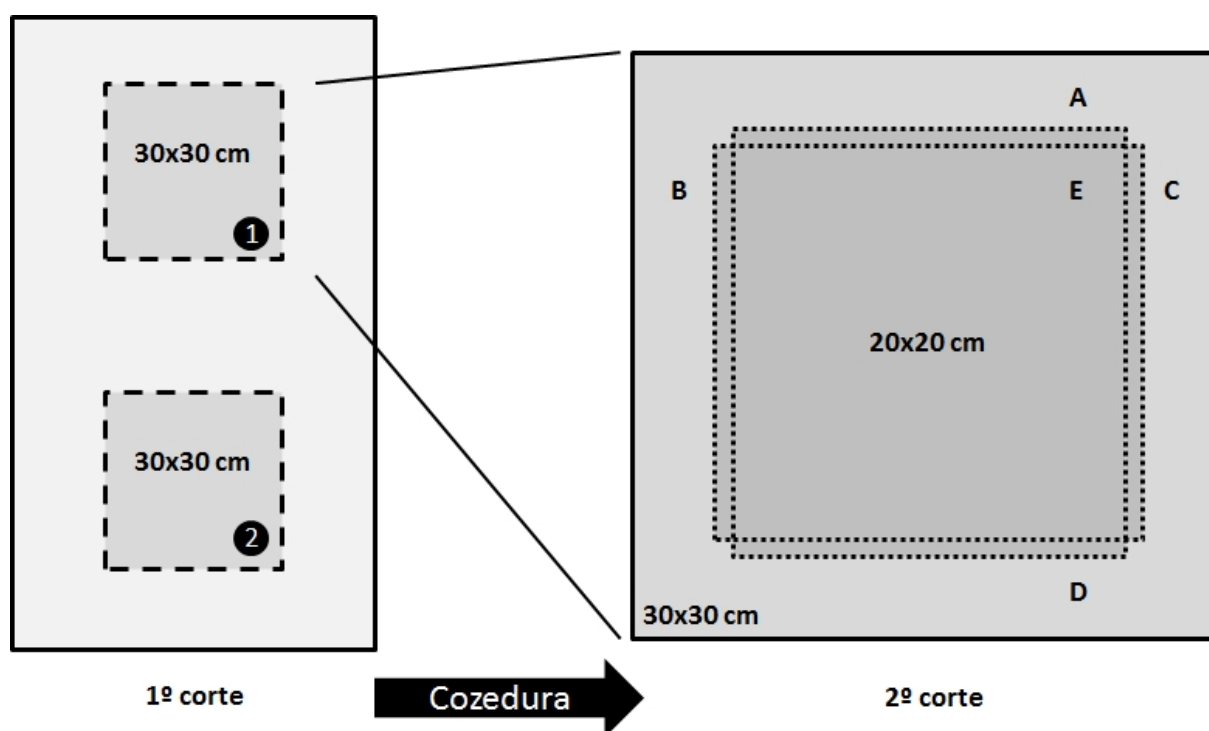


Figura 2: Esquema de cortes para cada amostra de cortiça. O 1º corte teve como base a prancha de cortiça colhida do sobreiro, onde se obtiveram placas de 30x30 cm. O 2º corte teve como base as placas de 30x30 cm previamente cozidas e secas. As tiras A, B, C e D possuem 20x1 cm.

Imediatamente após o primeiro corte foram medidas a densidade aparente das placas de cortiça e as dimensões dos três eixos, de forma a permitir quantificar *a posteriori* o ganho com o processo de preparação da cortiça. Os métodos de avaliação do calibre



(crescimento ao longo do eixo radial) e a medição da densidade aparente são aprofundados mais à frente.

Após as medições preliminares, as placas de cortiça foram sujeitas a uma cozedura, estando imersas num banho com água a aproximadamente 90° C, durante uma hora. As amostras cozidas foram deixadas a secar ao ar protegidas da luz directa do Sol, por 34 dias, sujeitas à acção de alguns pesos para que fossem aplanadas e assim melhorar as suas condições de manipulação.

Findo este prazo, procedeu-se a um corte final das placas de 30x30 cm em pranchas de 20x20 cm (figura 2 - 2º corte). Este último corte originou ainda 4 tiras de 20 cm<sup>2</sup>, correspondendo às 4 faces laterais das pranchas, para todas as amostras, excepto para a placa 1 da amostra HL12 que, por questões de quantidade, apenas originou duas tiras (HL12-1-B e HL12-1-C). Com vista a melhorar a qualidade das fotografias que seriam tiradas para a análise de imagem, as faces obtidas pelo corte foram lixadas até se tornarem lisas e sem relevos que pudessem originar sombras.

### **2.2.2. Avaliação do Teor de Humidade da Cortiça**

Durante o tempo de secagem da cortiça cozida foi medido o teor de humidade. Uma semana após a cozedura, foram retiradas 2 tiras de cortiça com cerca de 1 mm<sup>2</sup> de duas faces laterais de cada placa de 30x30 cm. Cada uma das tiras foi pesada em balança analítica e deixada a secar em estufa a 100°C, até atingir peso constante (conseguido ao fim de 7 dias em estufa), tendo-se procedido a pesagens intercalares ao fim dos 2º e 5º dias em estufa. Uma segunda medição do teor de humidade foi avaliada noutras tiras cortadas ao fim de 12 dias após a cozedura, procedendo-se da mesma forma já descrita, mas com medições intercalares ao 2º e 4º dias em estufa.

O teor de humidade foi calculado de acordo com a fórmula seguinte:

$$TeordeHumidade (\%) = \frac{Peso_{inicial} (mg) - Peso_{seco} (mg)}{Peso_{seco} (mg)} \times 100$$

### **2.2.3. Avaliação do calibre da cortiça e do ganho com a cozedura**

Para cada placa de 30x30 cm, e ainda antes da cozedura, mediu-se a espessura em oito pontos distintos, sendo dois pontos em cada uma das faces radiais e outros dois em cada uma das faces transversais. Os locais de medição da espessura foram marcados para permitir uma nova medição nos mesmos locais após a cozedura. Através da medição da

espessura após a cosedura e a secagem das placas de cortiça, pôde-se estimar o ganho com esta acção.

#### **2.2.4. Medição da densidade aparente da cortiça**

Cada placa de cortiça foi pesada de forma a conseguir-se uma avaliação preliminar da sua densidade. A massa foi determinada por pesagem e o volume foi determinado pelo método de imersão em água (princípio de Arquimedes), no qual se submergiram as placas em água e se mediu a variação do peso provocado pela deslocação de água. Esta análise preliminar avaliou não só a densidade da cortiça propriamente dita, como também considerou a densidade da costa, que não tem utilidade em termos industriais.

A densidade da cortiça foi calculada de acordo com a fórmula seguinte:

$$Densidade(g \cdot cm^{-3}) = \frac{Pesocortiça(g)}{\left( \frac{Pesocorticasubmergida(g) - Peso\acute{a}gua(g)}{Densida\grave{a}gua(1 g \cdot cm^{-3})} \right)}$$

A densidade da cortiça foi novamente calculada, segundo os mesmos princípios, após a cozedura e o segundo corte, tendo-se então calculado a densidade das quatro tiras originadas por este último corte (tiras A, B, C e D), tal como da prancha de 20x20 cm. Também esta medição teve em consideração a costa.

#### **2.2.5. Cálculo da percentagem de defeitos**

De modo a quantificar a percentagem de defeitos presentes em cada placa de cortiça, estas foram fotografadas, após cozedura e segundo corte, nas duas faces de cada uma das tiras de 20 cm<sup>2</sup> e nas quatro faces das pranchas de 20x20 cm. De forma a conseguir um melhor contraste, as superfícies foram fotografadas ao Sol, com uma máquina *Samsung 10 MP L201*, de 10 Megapixels. De forma a permitir calibrar o programa de análise de imagem, todas as fotografias tinham de uma escala de 3 cm posicionada à altura da superfície fotografada.

A análise de imagem foi realizada com o *software Leica – QWin*. Após a calibração de cada imagem, esta foi submetida a uma detecção automática dos defeitos. Uma vez que o *software* não conseguia distinguir satisfatoriamente os defeitos e a costa, houve necessidade de se proceder a uma selecção manual de forma a ficarem seleccionadas apenas as inclusões madeirentas e os poros. As áreas seleccionadas correspondentes a

cada tipo de defeitos foram medidas, assim como a área total, sem costa, de modo a calcular a percentagem de defeitos em cada amostra de cortiça.

O cálculo da percentagem de defeitos geral, de porosidade estrita ou de inclusões madeirentas foi conseguido segundo a fórmula:

$$\text{Percentagem de defeitos} = \frac{\text{Defeitos considerados } (\mu\text{m}^2)}{\text{Área total da cortiça sem costa } (\mu\text{m}^2)} \times 100$$

Para os arranjos de *clustering* utilizou-se o programa R 2.13.1 (R Development Core Team), optando-se pela distância euclidiana e utilizando-se o método “completo” da função *hclust*.

### **2.3. Obtenção de sequências ESTs de *Quercus suber* referentes a metiltransferases de DNA: análise *in silico***

As sequências dos genes de interesse referenciados como metiltransferases de DNA foram obtidas a partir de bibliotecas de ESTs, de dados normalizados de flores masculinas e de flores femininas de sobreiro, obtidas por pirosequenciação, no âmbito do projecto “Sobreiro 19 - Desenvolvimento dos gametófitos masculinos e femininos” - Cork Oak EST Consortium, 2010 e escolhidas de acordo com a anotação inicial produzida pelo Parque de Ciência e Tecnologia Biocant. As sequências obtidas foram submetidas a pesquisas de homologia com os programas *blastn*, *blastp* e *blastx* (Altschul *et al.*, 1997). Com os resultados das diversas pesquisas de homologia, conseguiu-se prever qual o grupo a pertencia cada uma das sequências isoladas tendo sido atribuídos as seguintes designações CromoMetilTransferases (CMT), Domains Rearranged Methyltransferases (DRM) ou apenas METiltransferases (MET). Aquelas que estavam indicadas como metiltransferases de DNA (DNMT), foram escolhidas e confirmadas através da homologia com sequências já conhecidas de espécies como *Arabidopsis thaliana*, *Elaeis guineenses*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Vitis vinefera*, *Nicotina tabaccum* e *Arabidopsis lyrata*. Para a validação das sequências e para o seu agrupamento consoante a classe, teve-se em consideração as homólogas encontradas e a presença de domínios específicos de cada um dos grupos. Dentro de cada grupo, procedeu-se ao alinhamento das sequências, duas a duas (usando o programa *bl2seq*) e ainda ao alinhamento múltiplo (através do programa *clustalw*), para eliminar possíveis sequências repetidas e com orientações opostas. Nos casos em que se obtiveram várias sequências para o mesmo gene, foi desenhada uma

sequência consenso. Com os resultados das buscas de homologia (blastn e blastx), verificou-se ainda que algumas das sequências isoladas, correspondiam às mesmas entradas na base de dados do NCBI, mas com locais de alinhamento distintos, sendo por isso consideradas múltiplas sequências do mesmo gene. Cada sequência recebeu um nome de acordo com o grupo a que pertencia e com as homologias encontradas nas bases de dados disponíveis.

De forma a conseguir estudar o gene *MET1* nas nossas amostras, e uma vez que este gene não foi encontrado nas bibliotecas disponíveis, usou-se uma sequência gentilmente cedida pelo Dr. Jorge Paiva, também de *Q. suber*, que apresentava homologias com as sequências do mesmo gene em *A. thaliana*. Uma vez obtida, a sequência foi tratada como todas as outras.

Ainda durante a análise bioinformática, foi feita uma comparação da organização genómica entre os genes em estudo e os seus homólogos em *A. thaliana* ou *V. vinífera*, de modo a prever os locais dos intrões nos genes de *Q. suber*. De acordo com esta análise, e para cada uma das sequências previamente escolhidas, foi desenhado um par de primers (quadro 1), através do programa Primer Premier 5 (Premier Biosoft), de forma a desenhar, sempre que possível, os primers em dois exões diferentes.

Quadro 1: Primers desenhados para qRT-PCR, respectivas temperaturas de “melting” (T<sub>m</sub>) e dimensão do produto amplificado esperado para cada sequência em pares de bases (pb).

<b>Sequência</b>	<b>Primer</b> <i>Forward / Reverse</i>	<b>T<sub>m</sub></b> (° C)	<b>Produto</b> <b>amplificado (pb)</b>
<i>QsMET1</i>	5' – GCTGATGATGGAAGTGG – 3' 5' – TACGGATTGAAATGAAAAC – 3'	56	160
<i>QsMET2</i>	5' – AGTTATTATCGGTATGTGAAGG – 3' 5' – ATCGGAGTAAGGGAGCAA – 3'	56	238
<i>QsDRM2</i>	5' – TCCCTTTGAAGAATGTTG – 3' 5' – GATGCCTGTTGCTACCTG – 3'	56	224
<i>QsCMT3</i>	5' – CGTTTATGGTGGGATGAG – 3' 5' – ACAGGAACCGCAACAGCA – 3'	56	200
<i>QsDMAP1</i>	5' – TATCACTGGGTCAGGGTTGT – 3' 5' – GCTCGTTTGCGTTCTATCTC – 3'	56	366

### 2.3.1. Análise filogenética das sequências de DNMTs

As sequências isoladas a partir das bibliotecas de ESTs foram submetidas a programas de análise filogenética, para verificar a relação que teriam com sequências presentes noutras espécies. Foi sempre utilizada a sequência putativa de aminoácidos, de forma a garantir um bom alinhamento. Foram realizadas quatro análises, uma para cada classe e para a proteína associada à MET1, utilizando-se as suas homólogas já caracterizadas (Anexo I). Utilizaram-se os programas disponíveis no site <http://phylogeny.fr> (Dereeper *et al.*, 2008), optando-se pelo modo *one click*, que por sua vez inclui alinhamentos efectuados pelo algoritmo MUSCLE, uma correcção do melhoramento através do algoritmo Gblocks e o programa de máxima verosimilhança PhyML. As árvores foram construídas com o software TreeDyn.

### 2.3.2. Extracção de RNA total e síntese de cDNA

O RNA foi extraído das amostras de felogénio das seis árvores previamente escolhidas, usando-se o kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante. Para confirmar a integridade do RNA extraído, correram-se 5 µl num gel de agarose a 1,5%. A concentração de RNA obtida foi quantificada num leitor Synergy HT (Bio-Tek), usando-se 2 µl da solução de RNA.

Para a obtenção do cDNA foi utilizado o kit RETROscript (Ambion), seguindo-se as instruções do fabricante. Dadas as flexibilidades do protocolo, optou-se pelo procedimento a dois passos com desnaturação inicial, no qual 0,25 µg de RNA total foram misturados com 2 µl de primers oligo(dt), a 10mM e o volume final foi ajustado com água desionizada para um volume final de 12 µl. O RNA foi então incubado a 82° C durante 3 minutos para desnaturação, tendo-se seguido a adição dos restantes componentes, como indicado no protocolo do kit. A concentração de cDNA obtido foi também calculada, tal como descrito para a quantificação do RNA. Quer o RNA, quer o cDNA foram armazenados, entre posterior utilização, a -20° C.

De modo a escolher um gene de referência foram testados, através do algoritmo Normfinder (Andersen *et al.*, 2004), vários primers referentes a genes de manutenção (*housekeeping*), tendo sido escolhido o gene da *actina* (*forward* 5' – tggattctggtgatggtgtgagtc

- 3' e reverse 5' – caatttcccggttcagcagtagtg – 3') por apresentar melhores resultados, quer em termos de qualidade da amplificação, quer em termos de estabilidade entre amostras.

### 2.3.3. PCR quantitativo em tempo real (qRT PCR)

Para avaliar a expressão das metiltransferases em estudo e da *actina*, nas 6 amostras de felogénio, procedeu-se a uma análise em PCR quantitativo em tempo real (MyiQ2, Bio Rad), utilizando-se placas brancas (Bio Rad). Cada reacção de PCR continha 20 µl, dos quais 2 µl correspondiam ao par de primers (5mM + 5mM) e 10 µl de uma solução de EvaGreen™ diluída a 1:1 da solução original. Os restantes 8 µl da reacção foram distribuídos entre água autoclavada e cDNA, de forma a garantir a quantidade exacta de 0,16 µg de cDNA para todas as metiltransferases em estudo, excepto no caso do gene *QsMET1*, para o qual foram utilizados 1,6 µg de cDNA, e no caso da *actina*, que necessitou de 2 µg de cDNA. O protocolo de PCR consistiu na desnaturação inicial a 95° C durante 2 minutos, 40 ciclos de amplificação, cada um correspondente a 15 segundos de desnaturação a 95° C, 30 segundos para *annealing* a 56° C e 30 segundos para a extensão a 76° C. A fluorescência foi medida no fim de cada ciclo, após a fase de extensão. Passados os 40 ciclos, realizou-se uma extensão final de 5 minutos a 72° C e a produção de uma curva de “melting”: aumento de 0,5° C a cada 10 segundos, dos 70 aos 95° C.

Os dados obtidos em qRT-PCR foram tratados em Microsoft® Excel 2010 (Microsoft). Para avaliação do *threshold cycle* (Ct) e da eficiência do gene foi utilizado o algoritmo LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003), cujos dados foram comparados com os Cts fornecidos pelo programa Bio-Rad iQ5 2.0.148, acoplado ao aparelho de PCR utilizado (Bio-Rad iQ5).

A análise estatística, quer dos dados obtidos para a análise da qualidade da cortiça, quer para o estudo da expressão de genes, foi processada no *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc).

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterização física da cortiça

##### 3.1.1. Estudo da densidade da cortiça

A medição da densidade da cortiça permitiu distinguir dois grupos de árvores, correspondentes às produtoras de cortiça de boa qualidade (com menor densidade – HL12, HL14 e HL16) face às árvores produtoras de cortiça de má qualidade (com maiores densidades – hl2, hl3 e hl18), sendo a separação entre os dois grupos acentuada com os dados após a cozedura (figura 3). Após a cozedura, a média da densidade das árvores produtoras de cortiça de boa qualidade foi de  $0,218 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  (com erro padrão de  $\pm 0,004$ ), significativamente menor do que os  $0,285 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  ( $\pm 0,007$ ) da média obtida para as árvores produtoras de cortiça de má qualidade ( $P\text{-value} < 0,0001$ ). Verificou-se uma redução da densidade com o processo de cozedura, tendo as árvores produtoras de má qualidade uma redução de 26,3% relativamente às cortiças de boa qualidade (24%) (quadro 2).

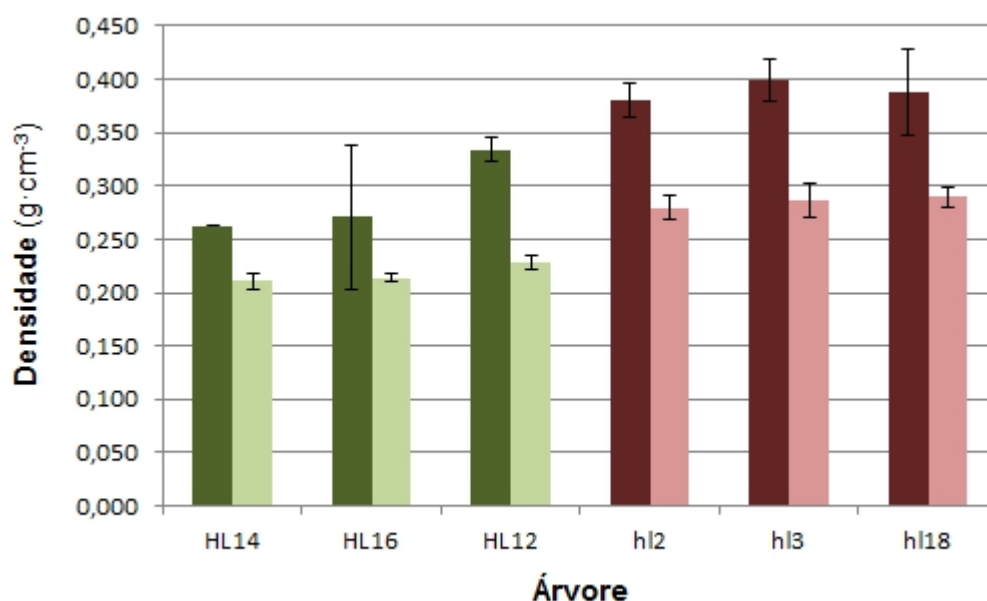


Figura 3: Resultados da análise da densidade da cortiça, antes da cozedura (barras escuras) e após a cozedura (barras claras), com os respectivos erros padrão. A verde assinalam-se as árvores produtoras de boa cortiça (HL14, HL16 e HL12) e a vermelho as árvores produtoras de cortiça de má qualidade (hl2, hl3 e hl18).

Quadro 2: Redução da densidade da cortiça com o processo de cozedura.

	Árvore	Redução (%)
<b>Produtoras de boa qualidade</b>	HL12	32%
	HL14	19%
	HL16	21%
<b>Produtoras de má qualidade</b>	hl2	26%
	hl3	28%
	h18	25%

### 3.1.2. Estudo das propriedades físicas da cortiça

As placas de cortiça (30x30 cm) foram medidas e pesadas antes e depois do processo de cozedura. Em termos gerais, a cozedura da cortiça conduziu à perda de peso e ao amento das dimensões ao longo dos eixos radial e transversal, mas sem relação visível entre árvores produtoras de cortiça de boa qualidade e árvores produtoras cortiças de má qualidade (quadro 3). Em termos de ganho em espessura, verificou-se um aumento do calibre de todas as placas, mas, tal como no caso anterior, sem ser possível estabelecer uma relação com a qualidade da cortiça produzida por cada árvore. A comparação em termos de ganhos relativos entre as duas placas de cada amostra revela uma larga variabilidade intra-árvore, para todas medições excepto para o calibre, onde se nota uma tendência clara para a placa 2, proveniente de uma localização na árvore mais próxima do solo, ter um crescimento inferior à placa 1 (rever esquema de cortes na figura 2), porém, havendo sempre um aumento de calibre com o processo de cozedura (figura 4).



Quadro 3: Análise do efeito da cozedura nas placas de 30x30 cm, no peso, ganho em dimensão nos planos transversal e tangencial e ganho em termos de calibre. Os valores apresentados correspondem à média obtida para as duas placas de cada amostra e para a única placa da amostra HL14.

	Amostra	Inicial	Cozido	Diferença (cozido-inicial)	Ganho relativo
<b>Peso</b> (g)	hl2	0,792	0,784	-0,008	-1,01%
	hl3	0,745	0,744	-0,001	-0,13%
	HL12	0,458	0,459	0,001	0,22%
	HL14	0,714	0,860	-0,002	-0,28%
	HL16	0,882	0,860	-0,022	-2,49%
	hl18	0,779	0,771	-0,008	-1,03%
<b>Medição ao longo do plano transversal</b> (cm)	hl2	27	27	0	0,00%
	hl3	27	27	0	0,00%
	HL12	26	25	-1	-3,85%
	HL14	30	30	0	0,00%
	HL16	24	26	2	8,33%
	hl18	25	16	1	4,00%
<b>Medição ao longo do plano tangencial</b> (cm)	hl2	35	34	-1	-2,86%
	hl3	30	31	1	3,33%
	HL12	28	28	0	0,00%
	HL14	30	33	3	10,00%
	HL16	40	36	-4	-10,00%
	hl18	29	33	4	13,79%
<b>Calibre (plano radial)</b> (mm)	hl2	25,10	27,89	2,78	11,08%
	hl3	24,93	25,92	0,99	3,96%
	HL12	22,17	26,51	4,34	19,60%
	HL14	28,29	31,08	2,80	9,89%
	HL16	40,96	44,88	3,92	19,60%
	hl18	28,11	30,84	2,73	9,70%

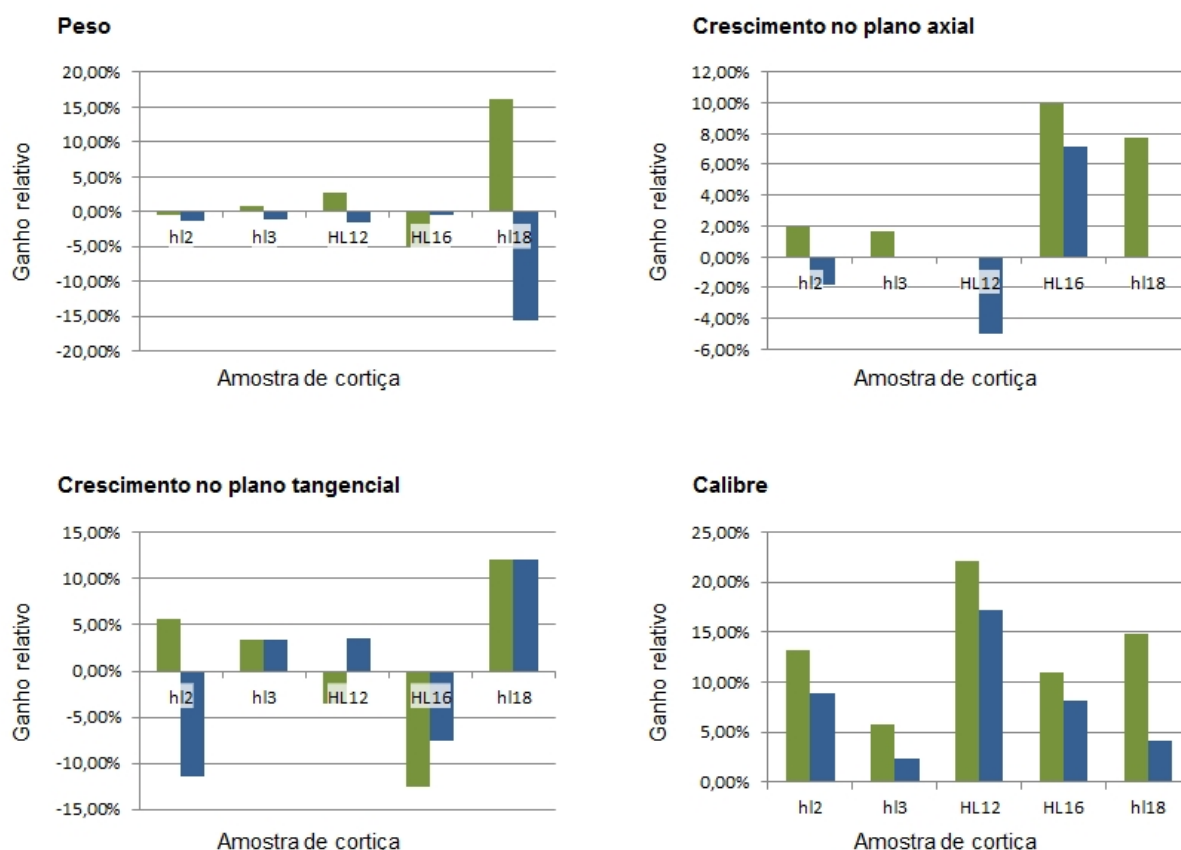


Figura 4: Comparação entre os ganhos relativos após cozedura para cada uma das medições nas duas placas de cada uma das árvores. A verde ilustra-se a medição da placa 1 e a azul a medição da placa 2. A amostra HL14 não foi utilizada neste estudo por apenas apresentar uma placa.

### 3.1.3. Teor de humidade da cortiça

A avaliação do teor de humidade da cortiça permitiu verificar as condições de secagem das amostras após a cozedura, de forma a garantir que a cortiça estaria com um teor de humidade muito reduzido antes de se avançar para o corte final que permite a obtenção de pranchas de 20x20 cm. As amostras de controlo, correspondentes às duas tiras de cortiça (1 mm<sup>2</sup>), recolhidas das duas faces laterais das placas cozidas, estabilizaram o seu peso após 7 dias em estufa a 100° C (figura 5). O teor de humidade foi medido com tiras obtidas após 7 dias (1ª série) e 12 dias (2ª série) de secagem ao ar. Ao fim de 12 dias, o teor de humidade das placas de cortiça é geralmente mais baixo do que os valores obtidos para as tiras cortadas ao fim dos 7 dias. O teor de humidade estará então entre 6% (HL16-x) e 10% (HL12-1) com um possível desvio na amostra hl2-2 (35%) (quadro 4).

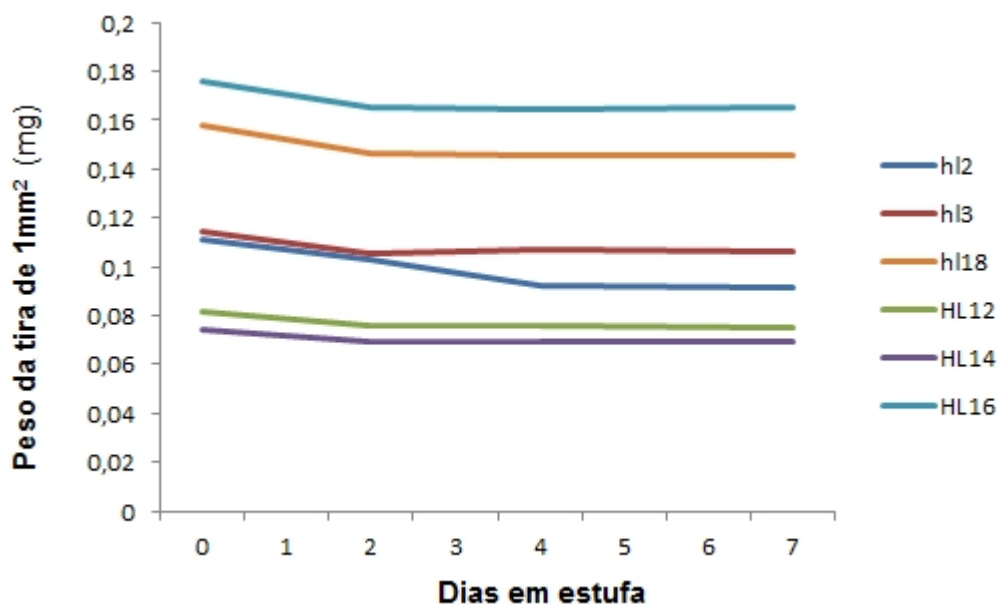


Figura 5: Evolução do peso da segunda série de tiras de cortiça cortadas para controlo de humidade, obtidas 12 dias após a cozedura. As pesagens intercalares foram feitas nos dias 2 e 4 em estufa, com pesagem final ao fim de 7 dias em estufa.

Quadro 4: Teor de humidade da cortiça, usando como referência as duas séries de controlo. A primeira série corresponde à humidade presente após 7 dias de cozedura face aos 12 dias da segunda série.

Amostra	Placa	1ª série (7 dias após cozedura)	2ª série (12 dias após cozedura)
hl2	1	12%	7%
	2	17%	35%
hl3	1	8%	7%
	2	8%	9%
hl18	1	9%	8%
	2	11%	9%
HL12	1	9%	10%
	2	9%	8%
HL14	-	7%	9%
HL16	1	10%	6%
	2	7%	6%

### 3.1.4. Análise de imagem

A análise de imagem efectuada às pranchas de cortiça anteriormente caracterizadas foi feita com o objectivo de quantificar as irregularidades presentes nas cortiças de boa e de má qualidade. Assim, foram determinadas as percentagens de defeitos, de porosidade estrita e de inclusões madeirentas (exemplos na figura 6).

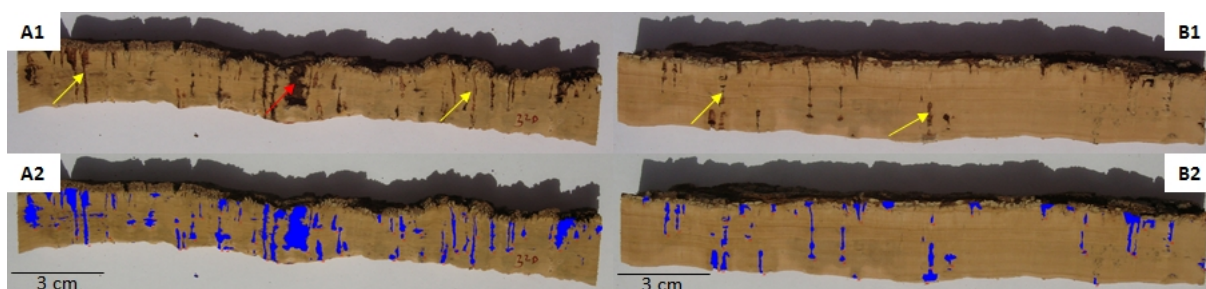


Figura 6: Selecção de poros (setas amarelas) e inclusões madeirentas (seta vermelha), antes e depois da análise de imagem com o *software* usado (1 e 2, respectivamente). A: amostra hl3 (má qualidade); B: amostra HL16 (boa qualidade).

As cortiças de boa qualidade (HL) mostram uma percentagem média de 6,88  $\pm$  0,28), onde se destaca a amostra HL12 com o valor mais baixo obtido (5,44%  $\pm$  0,47). O grupo das amostras de má qualidade revela-se com uma percentagem média de 12,63  $\pm$  0,41), sendo de destacar a amostra hl18 como a amostra com a maior percentagem de defeitos (14,42%  $\pm$  0,46) (figura 7-A). Estes valores permitem colocar distintamente as amostras de boa e de má qualidade em grupos distintos (P-value < 0,0001) (figura 7-B).

Na análise da percentagem de inclusões madeirentas, obteve-se um valor de 2,60% ( $\pm$  0,20) para as amostras boas, sendo de destacar a amostra HL16 com o valor mínimo de 2,06% ( $\pm$  0,23). Relativamente ao grupo das amostras de má qualidade (com uma percentagem média de 7,51  $\pm$  0,40), destaca-se novamente a amostra hl18 com a maior percentagem de 9,03 ( $\pm$  0,53). A análise da percentagem de inclusões madeirentas revela também dois grupos significativamente distintos de amostras, porém, com algumas diferenças em relação à análise anterior (P-value < 0,0001).

A percentagem de porosidade estrita revela que as amostras HL apresentam os valores extremos (com média de 4,28%  $\pm$  0,24), enquanto que as amostras hl mostram valores intermédios (em média 5,12%  $\pm$  0,21). A árvore HL16 apresenta o maior valor

(5,49%  $\pm$  0,31) ao passo que HL12 tem o menor (3,21%  $\pm$  0,32). Ainda assim, é possível estabelecer dois grupos estatisticamente diferentes com estas amostras, (P-value = 0,0093).

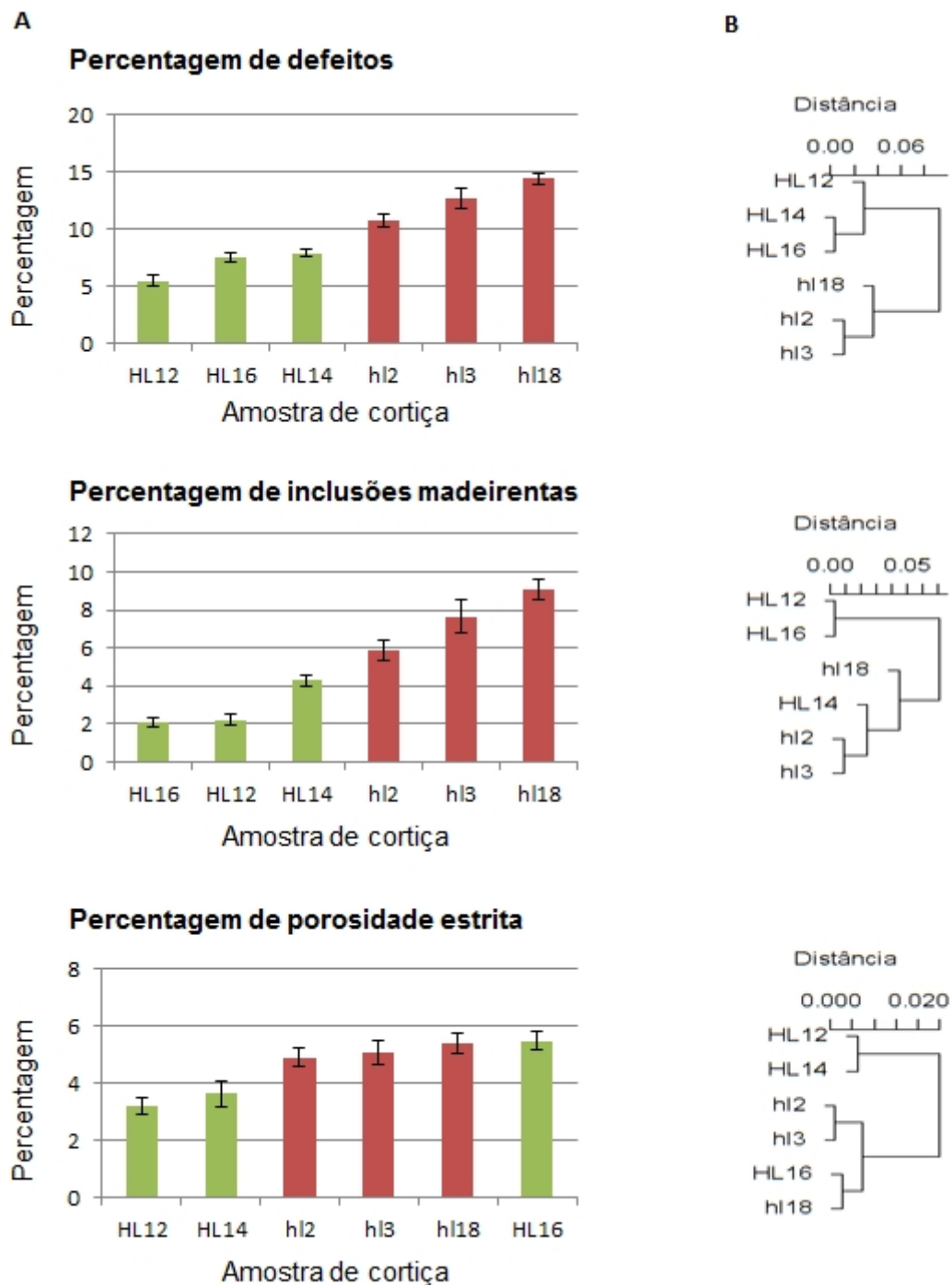


Figura 7: Percentagem média de defeitos, inclusões e de porosidade estrita para as diferentes amostras de cortiça, utilizando-se ambas as placas (1 e 2) e considerando-se ambos os eixos (radial e transversal). A verde as amostras consideradas de boa qualidade e a vermelho as amostras de má qualidade. Para cada avaliação, apresenta-se ainda o melhor agrupamento obtido em R (B).

Devido a terem sido recolhidas placas com localização distinta nas árvores (placa 1 e placa 2), foi possível fazer comparações dentro da mesma árvore, avaliando possíveis diferenças relacionadas com o posicionamento da cortiça na árvore. O tipo de cortes efectuados nas placas permitiu ainda uma análise comparativa das diferenças entre os eixos transversal e radial.

Ao avaliar a percentagem de defeitos, verificou-se uma tendência para a placa 1 mostrar mais defeitos em relação à placa 2, apesar de não haver significância estatística ( $P\text{-value} = 0,3198$ ) (figura 8 – A). Assim, para as placas de má qualidade, observa-se uma percentagem média de defeitos de 13,12% ( $\pm 0,58$ ) para as placas 1 e de 12,13% ( $\pm 0,57$ ) para as placas 2. No caso das amostras de boa qualidade, esta tendência foi descontinuada pela amostra HL12 que nos revela uma maior percentagem de defeitos na placa 2 (6,42%  $\pm 0,62$ ) do que na placa 1 (3,97%  $\pm 0,29$ ). Ainda dentro da percentagem de defeitos, mas comparando os dois planos em estudo (figura 8 – B), obteve-se alguma discrepância nos resultados. Assim, para as amostras hl2, hl18 e HL16, o plano radial apresenta sempre uma percentagem de defeitos superior ao plano transversal, sendo o oposto observável nas restantes três árvores. Os resultados variam entre a amostra hl18 com uma percentagem de 14,22 ( $\pm 0,85$ ) para o plano radial e 13,94% ( $\pm 0,75$ ) para o plano transversal e a amostra HL12 com as percentagens de 5,52% ( $\pm 1,10$ ) para o plano radial e 6,06% ( $\pm 0,76$ ) para o plano transversal.

No que diz respeito às inclusões madeirentas, todas as árvores revelam uma percentagem superior na placa 2, em relação à placa 1, excepto a amostra hl2 com a percentagem de 6,31 ( $\pm 0,51$ ) na placa 1, superior aos 5,37% ( $\pm 0,92$ ) observados na placa 2. As inclusões madeirentas são mais visíveis, no plano radial, para todas as árvores, excepto para a amostra HL12 que contraria a norma com uma percentagem de inclusões madeirentas na ordem dos 2,51% ( $\pm 0,52$ ) para o plano radial face aos 2,89% ( $\pm 0,84$ ) do plano transversal.

A análise da percentagem de porosidade estrita, no que toca à comparação entre as duas placas de cortiça, revela resultados similares aos já ilustrados para as inclusões madeirentas. Assim, todas as cortiças à excepção da HL12 mostram uma percentagem superior na placa 1. A amostra HL12 contraria esta tendência com uma percentagem de 2,63 ( $\pm 0,29$ ) para a placa 1 e de 3,59% ( $\pm 0,47$ ) para a placa 2. A porosidade estrita é mais determinante nos planos transversais do que nos planos radiais, tal como mostram os resultados obtidos. Ainda assim, neste caso, a amostra HL16 será uma excepção não significativa a esta regra com uma percentagem de 5,49 ( $\pm 0,58$ ) no plano radial e 5,42% ( $\pm 0,47$ ) no plano transversal.

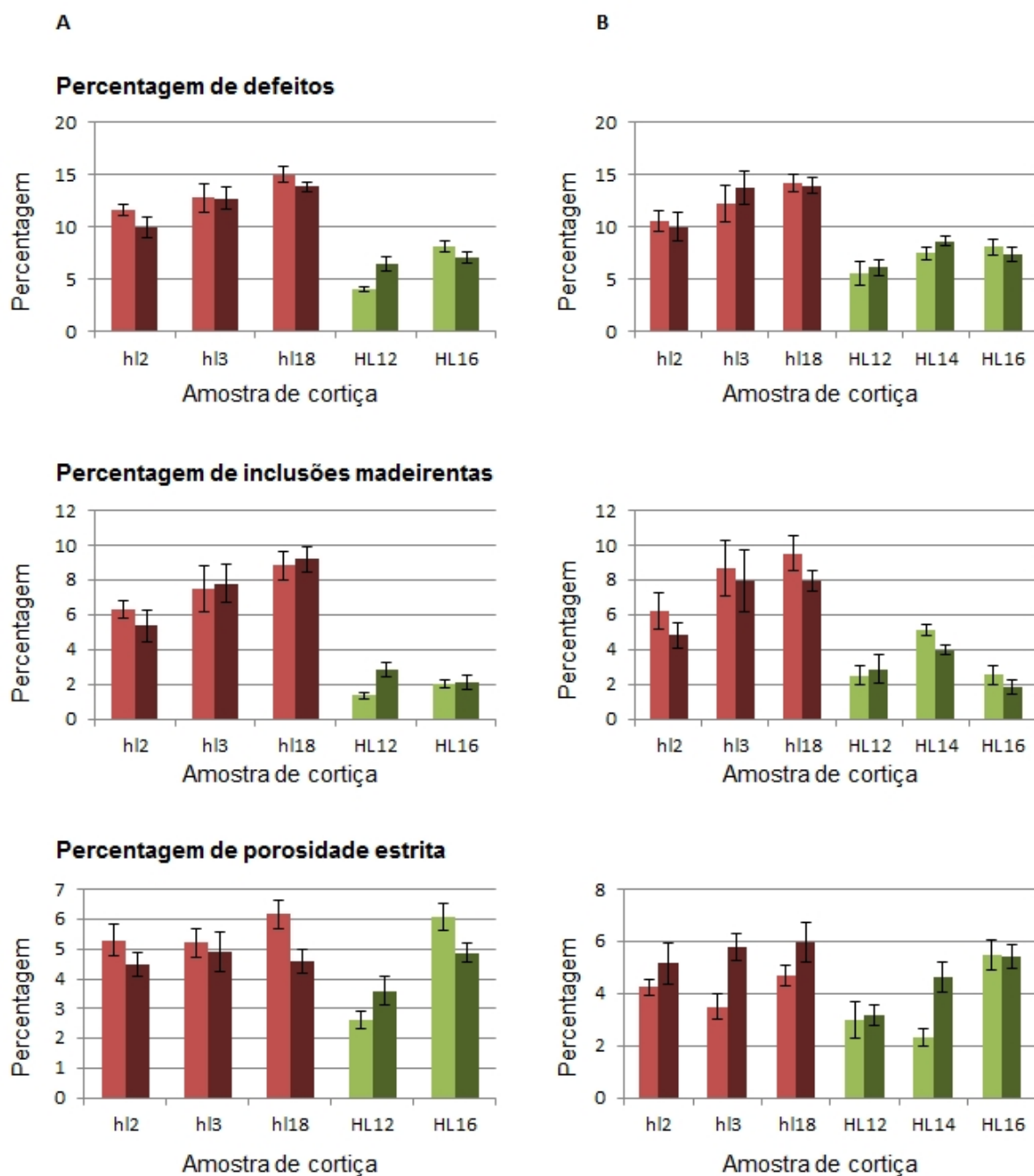


Figura 8: Percentagem de defeitos, inclusões e de porosidade estrita para as diferentes amostras de cortiça. A verde as amostras consideradas de boa qualidade e a vermelho as amostras de má qualidade. A: comparação entre a placa 1 (barras claras) e a placa 2 (barras escuras). B: comparação entre o plano radial (barras claras) e transversal (barras escuras).

Por fim, a comparação entre as duas placas de cada árvore revela uma tendência para uma menor percentagem de defeitos gerais nas placas 2, as quais estariam, na árvore, em posição inferior em relação à placa 1 (figura 8). Da mesma forma, nota-se um aumento da percentagem de defeitos nos planos transversais, relativamente aos planos radiais.

## 3.2. Análise da expressão génica no felogénio

### 3.2.1. Genes da família Metiltransferase de DNA (DNMT) e proteínas associadas em sobreiro

A pesquisa efectuada nas bibliotecas normalizadas de ESTs expressos nos gametófitos masculinos e femininos de sobreiro e as homologias encontradas nas bases de dados disponíveis (Anexo II) permitiram confirmar a presença de, pelo menos, uma DNMT de cada classe (METiltransferases - MET, Domains Rearranged Methyltransferases - DRM e CromoMetilTransferases - CMT) em *Quercus suber* e ainda uma proteína associada à MET1 (DnMt1-Associated Protein 1 - DMAP1). No quadro 5 são indicadas as similaridades encontradas nas bases de dados, para cada uma das sequências isoladas obtidas através de BLASTP.

Nas diversas buscas efectuadas, conseguiu-se verificar que todos as sequências utilizadas neste estudo tinham a presença de, pelo menos, um dos domínios caracteristicamente associados à sua classe. Assim, os genes *QsCMT3*, *QsDRM2* e *QsMET2* mostram os domínios pertencentes à superfamília AdoMet\_Mtases onde se estabelece a ligação destas enzimas ao dador do grupo metilo. O gene *QsMET1* revela o domínio DNMT1-RFD (Replication Foci Domain), responsável por conduzir a enzima para a forquilha de replicação durante a fase S. Por fim, o gene *QsDMAP1* apresenta dois domínios: (i) o domínio DMAP, exclusivo da sua família e (ii) o domínio SANT de ligação ao DNA, numa disposição característica destas proteínas.

Quadro 5: Correspondência entre as sequências dos genes isolados e as bases de dados disponíveis. Para cada referência é indicado o nome, o *accession number* e a espécie correspondente.

Gene	Referência	E-value	Cobertura (%)
<b><i>QsMET1</i></b>	Met1 (AAC39355.1 – <i>Daucus carota</i> )	9E-112	93
<b><i>QsMET2</i></b>	DNA-methyltransferase-2 (XP_002515552.1 – <i>Ricinus communis</i> )	1E-126	96
<b><i>QsDRM2</i></b>	EgDRM2 (ABW96890.1 – <i>Elaeis guineensis</i> )	1E-177	99
<b><i>QsCMT3</i></b>	EgCMT1 (ABW96889.1 – <i>Elaeis guineensis</i> )	1E-58	97
<b><i>QsDMAP1</i></b>	DMAP1 (XP_002515237.1 – <i>Ricinus communis</i> )	0	100



### 3.2.2. Análise filogenética das sequências isoladas

De modo a compreender a relação de proximidade existente entre as proteínas aqui estudadas e as descritas noutras espécies, procedeu-se a uma análise filogenética e utilizou-se o método da máxima verosimilhança. A análise efectuada para a classe MET revela que a sequência *QsMET2* é bastante diferente das restantes sequências em análise (figura 9-A). Dada esta diferença, construiu-se uma segunda árvore para esta classe, apenas com as sequências caracterizadas como *MET1* de forma a ser possível distinguir os diferentes ramos da árvore (figura 9-B). A sequência de *Q. suber* surge num dos três *clusters* com um valor de 67% associada às sequências de *Arabidopsis*, *Brássica* e *Populus*.

Para a classe DRM, voltou-se a verificar um agrupamento muito claro, em que sequências da mesma espécie se encontram agrupadas, com uma confiança de 98% para o agrupamento do género *Nicotiana* (figura 9-C). O gene *QsDRM2* foi agrupado junto das sequências de *Medicago truncatula*, evidenciando a sua proximidade, dado que ambas pertencem ao clade Fabidae (Rosid I).

Para a classe CMT, a árvore filogenética estabelece uma separação entre monocotiledóneas e dicotiledóneas. Sem surpresas, as diferentes sequências do género *Nicotiana* foram agrupadas com uma significância de 71,2% (figura 9-D). A sequência de *Q. suber* encontra-se num clade composto exclusivamente por Eudicotiledóneas.

As proteínas associadas à DNMT1 foram também agrupadas de acordo com a relação de proximidade entre as famílias envolvidas, estando o gene *QsDMAP1* num clade de Eudicotiledóneas muito próximo do seu homólogo em *Glycine max*, com uma confiança de 74% (figura 9-E).

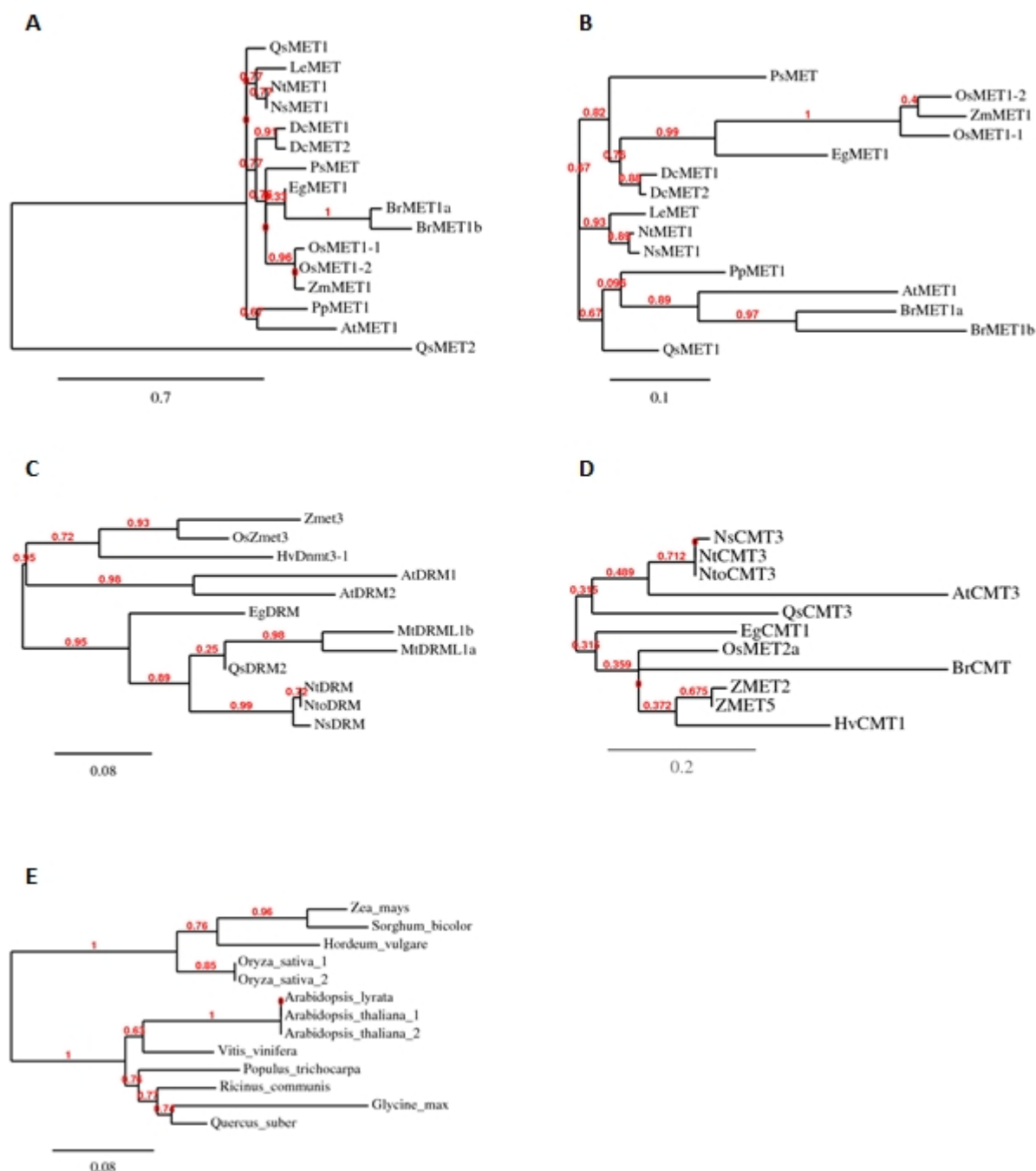


Figura 9: Relações filogenéticas entre as sequências em estudo de *Quercus suber* e as sequências homólogas em outras espécies. Análise para a classe MET (A e B, com e sem a sequência QsMET2, respectivamente), DRM (C), CMT (D) e DMAP1 (E). Os números de acesso destas sequências podem ser consultados no anexo I.

### Análise genómica para o gene *QsCMT3*

Gene de referência: *PREDICTED: hypothetical protein*  
(XM\_002283319.1 – *Vitis vinefera*)



### Análise genómica para o gene *QsDRM2*

Gene de referência: *DRM1*  
(NM\_121542.2 – *Arabidopsis thaliana*)



### Análise genómica para o gene *QsMET1*

Gene de referência: *MET1*  
(NM\_124293.3 – *Arabidopsis thaliana*)



### Análise genómica para o gene *QsMET2*

Gene de referência: *DNMT2*  
(NM\_122459.2 – *Arabidopsis thaliana*)



### Análise genómica para o gene *QsDMAP1*

Gene de referência: *DNA methyltransferase 1-associated protein 1*  
(NM\_180139.3 – *Arabidopsis thaliana*)



Figura 10: Estudo da caracterização genómica das sequências amplificadas, tendo como referência os genes homólogos que se encontram caracterizados noutras espécies. Note-se que a região amplificada (barra verde) não corresponde em escala ao tamanho da sequência amplificada, uma vez que as sequências de trabalho não continham intrões.

De modo a estudar a expressão destes genes no felogénio, foi isolado RNA total de amostras deste tecido pertencentes às árvores cuja cortiça foi previamente caracterizada (hl2, hl3, HL12, HL14, HL16 e hl18). Para cada uma das proteínas em estudo foram desenhados primers, (quadro 1), sempre que possível, apanhando dois exões ou cada um a abranger dois exões consecutivos, de forma a garantir que não haveria amplificação de DNA genómico. Para esta análise, os genes de estudo foram comparados com a estrutura genómica dos genes de referência de *Vitis vinífera* e *Arabidopsis thaliana* (figura 10). Para os genes *QsDRM2* e *QsMET1*, não foi possível o desenho dos primers em exões distintos, devido a potenciais formações de estruturas secundárias entre os mesmos.

Para avaliar a qualidade do RNA extraído, foram sujeitos a electroforese 5 µl de RNA num gel de agarose a 1,5%, tendo o gel revelado as duas bandas correspondentes às subunidades grande e pequena do RNA ribossomal, confirmando assim uma boa qualidade de RNA (figura 11).

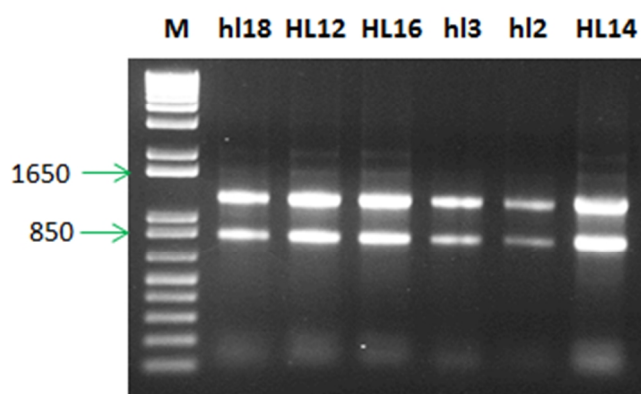


Figura 11: RNA total de seis amostras de felogénio. Gel de agarose a 1,5% com 5 µl de RNA total, tendo como referência o marcador (M) 1kb+ DNA Ladder.

### 3.2.3. Avaliação da qualidade da amplificação

Depois de confirmada a qualidade das amostras, foi sintetizado cDNA, o qual foi posteriormente usado em qRT-PCR.

Para avaliar a qualidade da amplificação em qRT-PCR, foi realizada uma curva de *melting*. A título de exemplo, é ilustrada na figura 12 a derivada da curva de *melting* de todos os genes amplificados na amostra HL16. Todos os genes, amplificados nas restantes

amostras, deram resultados bastante semelhantes, tendo sido considerado dispensável ilustrá-los aqui.

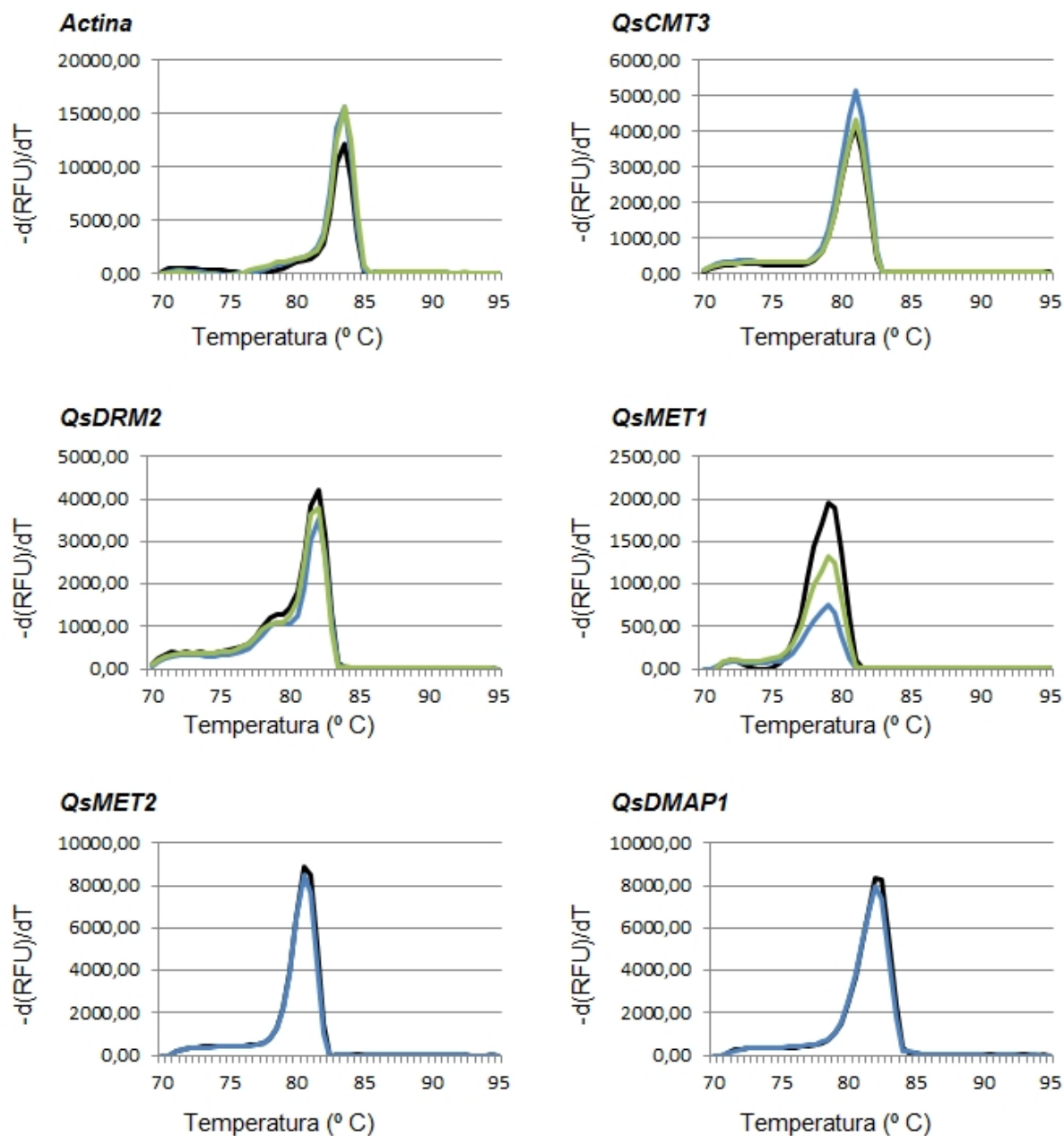


Figura 12: Derivada da curva de *melting* resultante da amplificação dos diferentes genes na amostra HL16, usada como exemplo. Para cada gene mostram-se as três curvas dos três triplicados, excepto para os gráficos correspondentes aos genes *QsMET2* e *QsDMAP1*, para os quais apenas se obteve um duplicado.

### 3.2.4. Análise da estabilidade dos genes em estudo

De modo a analisar a estabilidade dos genes previamente amplificados, foi usado o algoritmo Normfinder (Andersen *et al.*, 2004). Usando como normalizadora a árvore hl3, o gene da *actina*, utilizado como gene de referência no estudo de expressão, mostrou um coeficiente de estabilidade de 0,773 o que está dentro dos valores aceitáveis para um gene de referência. Nota-se ainda que o gene mais estável corresponde ao gene *QsDRM2*, com coeficiente de estabilidade na ordem dos 0,368. O gene menos estável entre as diferentes amostras, com coeficiente de estabilidade de 1,803, foi o gene *QsMET1* (figura 13-A). A mesma análise, mas normalizando os dados para a média das amostras de má qualidade (hl2, hl3 e hl18), revela algumas diferenças (figura 13-B). Neste caso, o gene mais estável continua a ser o gene *QsDRM2*, com um coeficiente de estabilidade de 0,589. A *actina* mantém-se dentro dos níveis de estabilidade aceitáveis, com um coeficiente de 0,741. Por fim, o gene menos estável continua também a ser o gene *QsMET1* (1,754).

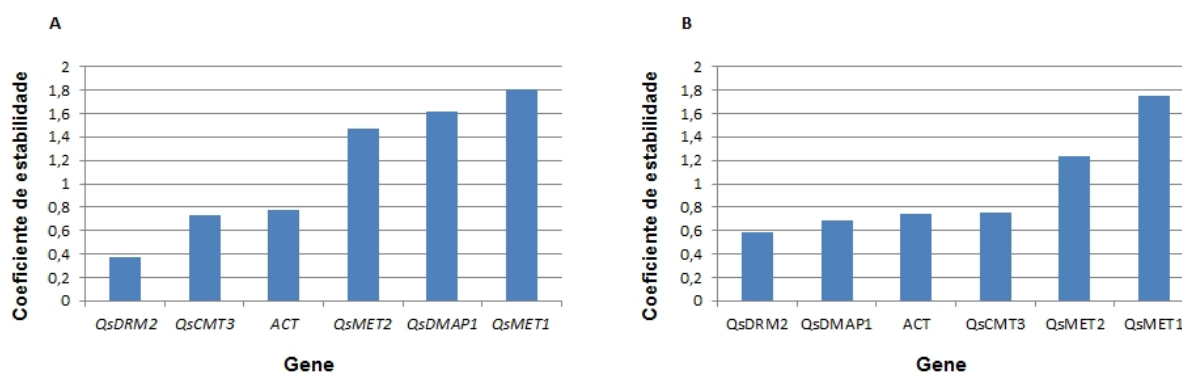


Figura 13: Valores de estabilidade dos diferentes genes estudados, nas diferentes amostras. A: Dados normalizados para a amostra hl3. B: Dados normalizados para a média das amostras más (hl2, hl3 e hl18).

### 3.2.5. Análise de expressão de genes DNMT

Para avaliar a expressão relativa das metiltransferases de DNA no felogénio activo, analisou-se a expressão de cada um gene nas diferentes árvores (figura 14). Tendo a expressão normalizada para o gene da *actina* e como referência a expressão do gene *QsDRM2*, dado que este se comporta como o mais estável, observamos que, em média, este é o gene com maior expressão. Todos os genes estudados apresentam variações de expressão no felogénio significativamente diferentes entre si (P-value < 0,0001). O gene

*QsMET1* é o que apresenta a menor taxa de expressão relativa ( $0,04 \pm 0,010$ ), enquanto as outras metiltransferases (*QsMET2* e *QsCMT3*) apresentam cerca de 40% da expressão da referência. O gene *QsDMAP1* possui a segunda menor expressão com cerca de 15% da expressão de *QsDRM2*.

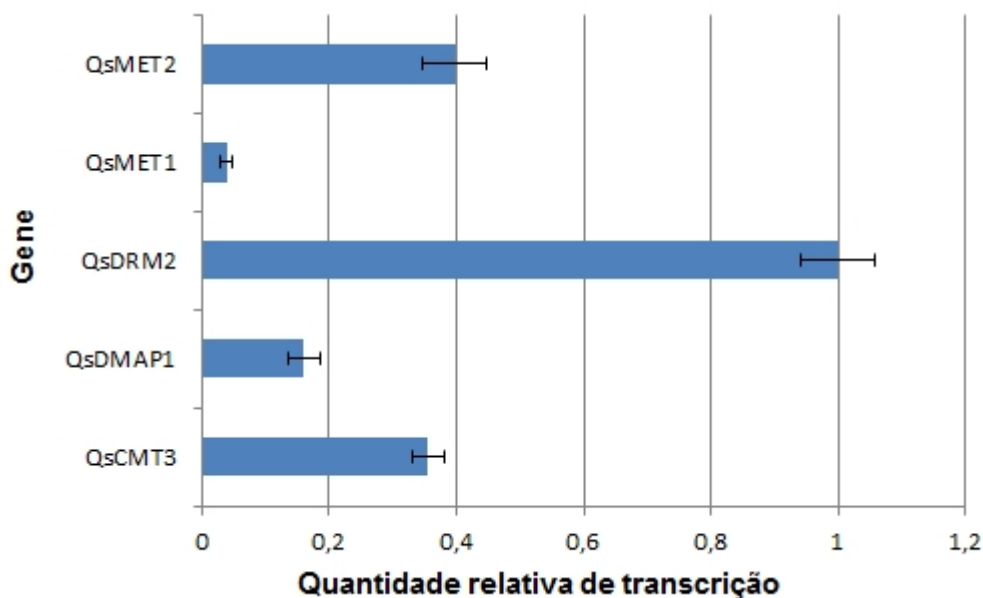


Figura 14: Expressão média relativa de cada gene, com dados normalizados para a expressão da *actina* e usando como referência o gene *QsDRM2*.

De modo a comparar a expressão destes genes em felogénios de árvores produtoras de boa e má cortiça, utilizou-se como normalizador o gene da *actina* e como referência a amostra hl3.

Para o gene *QsCMT3*, verificou-se que todas as árvores à excepção da HL14 apresentam uma expressão inferior à árvore controlo (figura 15). A árvore com maior expressão é HL14, uma árvore produtora de cortiça de boa qualidade ( $1,19 \pm 0,023$ ), em oposição à árvore HL16, que corresponde à árvore com menor expressão ( $0,12 \pm 0,023$ ), mas também esta uma árvore produtora de cortiça de boa qualidade. Estes dados contribuem para que estatisticamente não se possam estabelecer grupos distintos com estas amostras ( $P\text{-value}_{(HL)} < 0,001$ ;  $P\text{-value}_{(hl)} = 0,0368$ ).

O gene *QsDRM2* apresenta um resultado muito semelhante, com a amostra HL14 a expressar mais ( $1,01 \pm 0,111$ ) e igualmente a amostra HL16 com a menor expressão ( $0,14 \pm 0,045$ ). Os resultados da transcrição do gene *QsDRM2* permitem agrupar as amostras produtoras de cortiça de má qualidade, uma vez que elas não são estatisticamente

diferentes entre si. No entanto, o mesmo não acontece para as amostras de boa qualidade ( $P\text{-value}_{(HL)} = 0,0004$ ;  $P\text{-value}_{(hl)} = 0,0778$ ).

Destaca-se, ainda assim, e em termos gerais, uma maior tendência para uma maior expressão destes genes (*QsCMT3* e *QsDRM2*) em árvores de cortiça de menor qualidade.

O gene *QsMet1* revelou-se o gene com menor expressão entre todos os genes em estudo, tendo sido necessário dez vezes mais quantidade de cDNA para se conseguir obter a fase exponencial em qRT-PCR. Na análise de expressão deste gene encontra-se uma elevada variabilidade entre as diferentes árvores, não sendo clara uma correlação entre a expressão e a qualidade da cortiça produzida, nem significativa uma separação entre os dois grupos de qualidade da cortiça produzida ( $P\text{-value} = 0,9266$ ). Para este gene, a maior expressão é verificada na árvore hl2 (1,58 +/- 0,697) em oposição à árvore com menor expressão que, mais uma vez, foi a árvore HL16 (0,03 +/- 0,015).

No gene *QsMET2*, volta-se a encontrar diferenças de expressão entre as amostras produtoras de boa cortiça, em oposição ao grupo de produção de cortiça de má qualidade, sendo estas diferenças estatisticamente significantes ( $P\text{-value}_{(HL)} = 0,2353$ ;  $P\text{-value}_{(hl)} = 0,7758$ ;  $P\text{-value}_{(total)} = 0,0099$ ). As árvores produtoras de cortiça de boa qualidade têm menor expressão, estando novamente a árvore HL16 a expressar menos que todas as outras (0,27 +/- 0,034). A liderar a expressão, e como já tinha sido verificado para a expressão do gene *QsMET1*, encontra-se a árvore hl2 com uma expressão relativa de 1,16 (+/- 0,460).

O gene *QsDMAP1* é o gene com resultados mais distintivos. Neste caso, a árvore com uma maior expressão relativa é a árvore hl18 com 2,15 (+/- 0,085), em oposição à árvore HL16 com 0,60 (+/- 0,190). Note-se que, para este gene, o agrupamento entre árvores produtoras de cortiça de boa e de má qualidade é possível, com valores significativamente distintos ( $P\text{-value}_{(HL)} = 0,0615$ ;  $P\text{-value}_{(hl)} = 0,1496$ ;  $P\text{-value}_{(total)} = 0,0074$ ).

Para todos os genes aqui apresentados, excepto o *QsCMT3*, a análise estatística revela que as árvores hl2, hl3 e hl18 não têm diferenças significativas entre si, podendo ser consideradas como um todo, quer em termos de expressão, quer de densidade da cortiça e em alguns dos parâmetros da análise de imagem. Assim, torna-se interessante olhar para a expressão de cada uma das árvores boas, relativamente à média das árvores más. Para cada gene, verificou-se então a expressão das amostras HL12, HL14 e HL16 face à média das amostras produtoras de cortiça de má qualidade (figura 16).



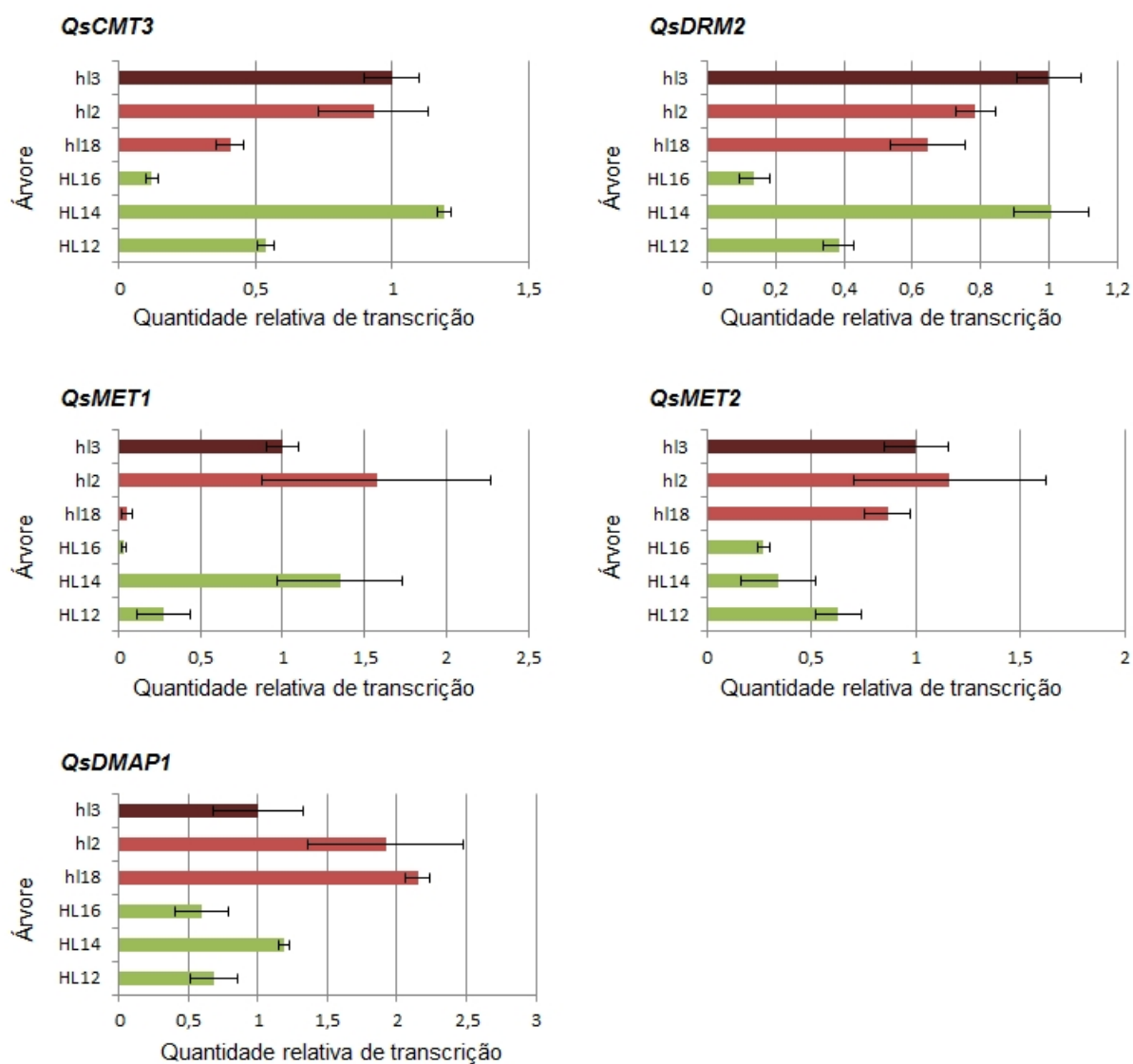


Figura 15: Análise comparativa da expressão dos genes em estudo, nos sobreiros amostrados, normalizados para a *actina* e usando como referência a amostra hl3. As árvores hl2 e hl18 são árvores produtoras de cortiça de má qualidade, face às árvores HL12, HL14 e HL16, correspondentes a produtoras de boa cortiça. Os cálculos de expressão foram realizados tendo em consideração os valores de Ct e eficiência fornecidos pelo programa LinRegPCR.

Tal como na análise já realizada, para o gene *QsCMT3*, a árvore HL14 é aquela que mostra uma maior expressão relativa (1,53 +/- 0,030), em oposição à árvore HL16 (0,16 +/- 0,029). Nesta análise, continua a não ser possível agrupar as amostras produtoras de boa cortiça dentro do mesmo grupo, dadas as elevadas diferenças entre os níveis de expressão ( $P\text{-value} < 0.0001$ ). O mesmo se aplica ao gene *QsDRM2*, com a árvore HL14 a expressar mais (1,24 +/- 0,137) e a árvore HL16 a expressar menos (0,17 +/- 0,055), não sendo também estatisticamente possível agrupar as árvores boas num só grupo ( $P\text{-value} = 0.0004$ ).

Nos restantes três genes (*QsDMAP1*, *QsMET1* e *QsMET2*), as amostras de boa qualidade revelam sempre uma menor expressão relativamente à referência.

O gene *QsDMAP1* tinha já mostrado resultados mais evidentes quando se correlaciona a sua expressão com a qualidade da cortiça produzida. De facto, para este gene e nesta nova análise, é estatisticamente significativo o agrupamento das amostras produtoras de cortiça de boa qualidade, e é significativa a diferença entre os dois grupos de qualidade ( $P\text{-value}_{(HL)} = 0,0615$ ;  $P\text{-value}_{(total)} = 0,0074$ ). A expressão relativa varia entre os 0,70 (+/- 0,023) da amostra HL14 e os 0,35 (+/- 0,112) da amostra HL16.

Para o gene *QsMET1*, a análise permite agora agrupar as árvores produtoras de boa cortiça dentro do mesmo grupo, mas continua a não permitir separar estatisticamente os dois *clusters* ( $P\text{-value}_{(HL)} = 0,2421$ ;  $P\text{-value}_{(total)} = 0,2370$ ). Apesar da amostra HL14 continuar a ser aquela que apresenta maior expressão em termos médios (0,72 +/- 0,204), é, neste caso, seguida de muito perto pela amostra HL12 (0,70 +/- 0,423). Mais uma vez, a árvore HL16 é de todas a que apresenta níveis de expressão inferiores, com uma expressão relativa de 0,08 (+/- 0,038).

Finalmente, no gene *QsMET2*, os níveis de expressão variam entre a amostra HL12, com uma expressão relativa de 0,62 (+/- 0,112), e a amostra HL16, com uma expressão de apenas 0,27 (+/- 0,027). Tal como na análise anterior, o agrupamento das amostras boas continua a ser possível, sendo também possível separar estatisticamente ambos os grupos e diferenciar através deste gene as amostras produtoras de cortiça de boa qualidade face às de má qualidade ( $P\text{-value}_{(HL)} = 0,2353$ ;  $P\text{-value}_{(total)} = 0,0099$ ).

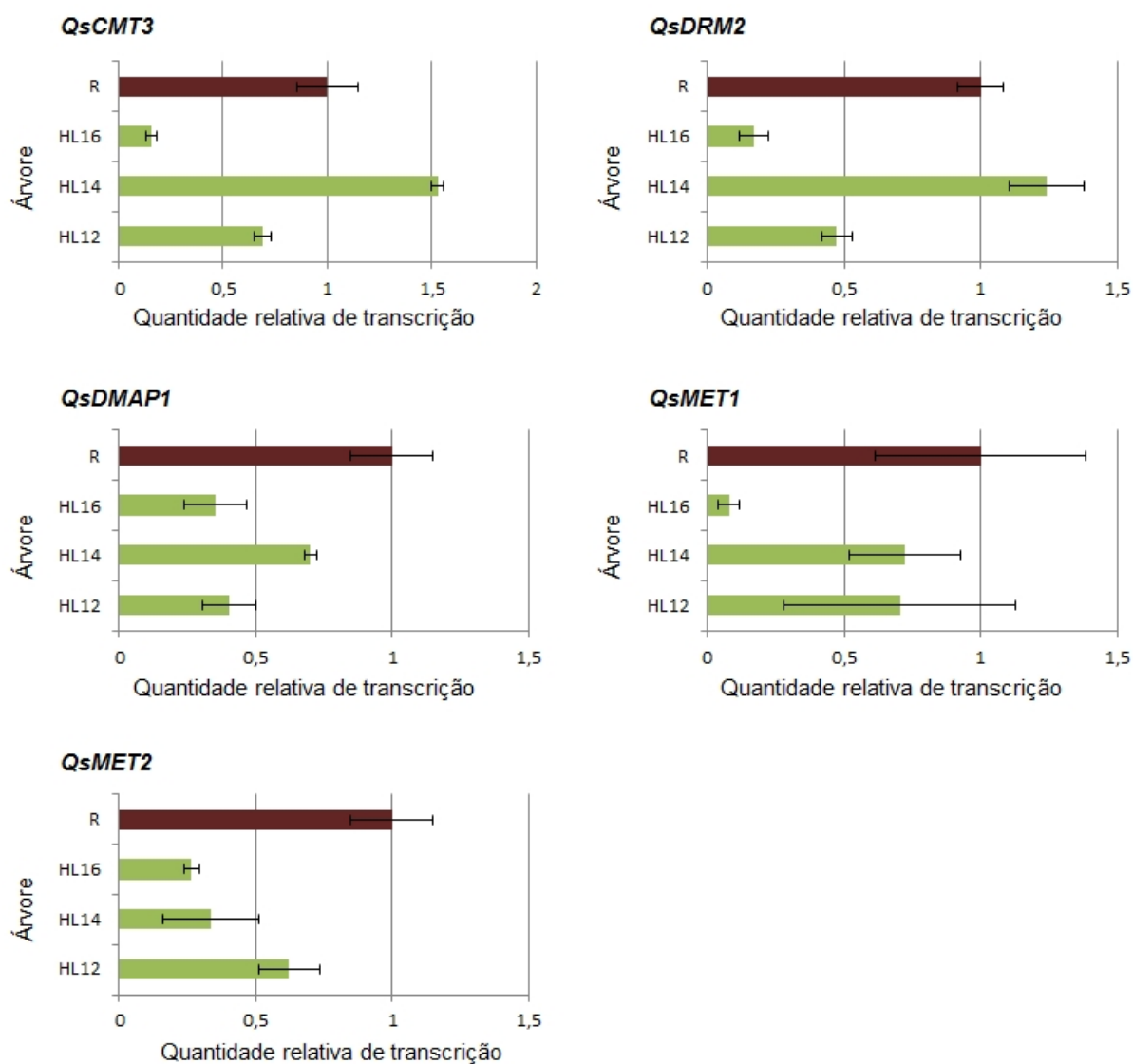


Figura 16: Análise comparativa da expressão dos genes em estudo, nos sobreiros produtores de cortiça de boa qualidade, normalizados para a *actina* e usando como referência (R) a média das amostras produtoras de cortiça de má qualidade (hl2, hl3 e hl18).

### 3.3. Relação entre a qualidade da cortiça e a expressão génica

Dados os diferentes resultados obtidos ao longo do trabalho, procurou-se estabelecer correlações entre si.

Uma vez que os resultados da densidade da cortiça estavam bastante próximos da análise visual previamente feita, procurou-se uma relação entre a densidade, em função das percentagens obtidas pela análise de imagem, tendo-se verificado que existia uma correlação entre a densidade e a percentagem de defeitos brutos suportada por  $R^2 = 0,779$  e a correlação entre a densidade e as inclusões madeirentas ( $R^2 = 0,784$ ) (figura 17-A e B). No entanto, não é possível estabelecer uma correlação significativa entre a densidade e a percentagem de porosidade estrita ( $R^2$  de 0,262) (figura 17-C).

Sendo que os resultados ilustrados até aqui parecem mostrar que a relação entre a percentagem de porosidade estrita e a qualidade da cortiça não é tão significativa quanto seria de esperar, procurou-se correlacionar os resultados da porosidade com o calibre da cortiça. Assim, verificou-se uma ligeira tendência positiva entre a percentagem de porosidade estrita e o calibre da cortiça ( $R^2 = 0,292$ ) (figura 17-D).

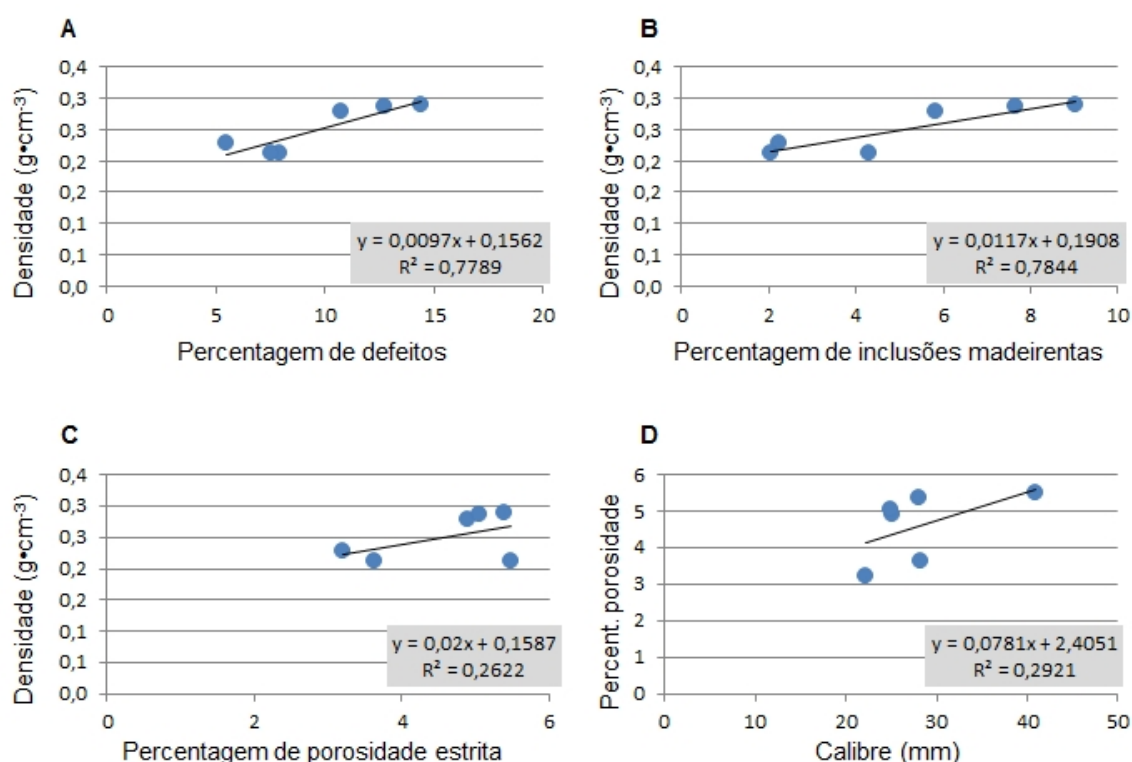


Figura 17: Coeficiente de relação entre os diferentes resultados referentes à qualidade da cortiça. A, B e C: Relação entre a densidade e a percentagem geral de defeitos, inclusões madeirentas e porosidade estrita, respectivamente. D: Relação entre a percentagem de porosidade estrita e o calibre medido antes da cozedura.

Na análise da expressão gênica *per si*, não é possível estabelecer uma correlação entre os genes *QsMET1* e *QsDMAP1* ( $R^2 = 0,065$ ) (figura 18), enquanto que entre os dois genes pertencentes à mesma classe, *QsMET1* e *QsMET2*, verifica-se uma correlação suportada por  $R^2$  de 0,597.

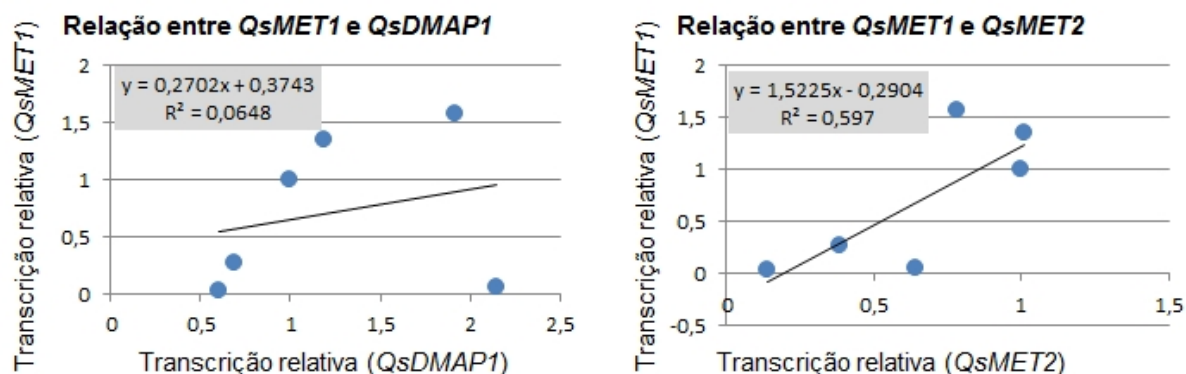


Figura 18: Coeficiente de relação entre a expressão do gene *QsMET1* e dos genes *QsDMAP1* e *QsMET2*.

Finalmente, avaliaram-se as possíveis correlações entre a expressão de metiltransferases de DNA e a qualidade da cortiça. Dos cinco genes em estudo, apenas em *QsDMAP1* e *QsMET2* foi possível agrupar as árvores em dois grupos consoante a qualidade da cortiça produzida. Assim, avaliou-se a relação entre estes dois genes e a densidade da cortiça, tal como com os valores das três percentagens de defeitos que se obtiveram na análise de imagem (figura 19).

A expressão do gene *QsDMAP1* mostra uma correlação positiva e significativa ( $0,50 < R^2 < 0,59$ ) para todos os parâmetros, excepto para a percentagem de porosidade estrita ( $R^2 = 0,119$ ). Destaca-se a forte relação da expressão deste gene com a percentagem de inclusões madeirentas, com um  $R^2 = 0,544$ . No entanto, não foi possível encontrar uma correlação significativa destas percentagens com o gene *QsMET2*. Ainda assim, nota-se uma tendência positiva ( $R^2 = 0,217$ ) entre a expressão deste gene e a percentagem de inclusões madeirentas.

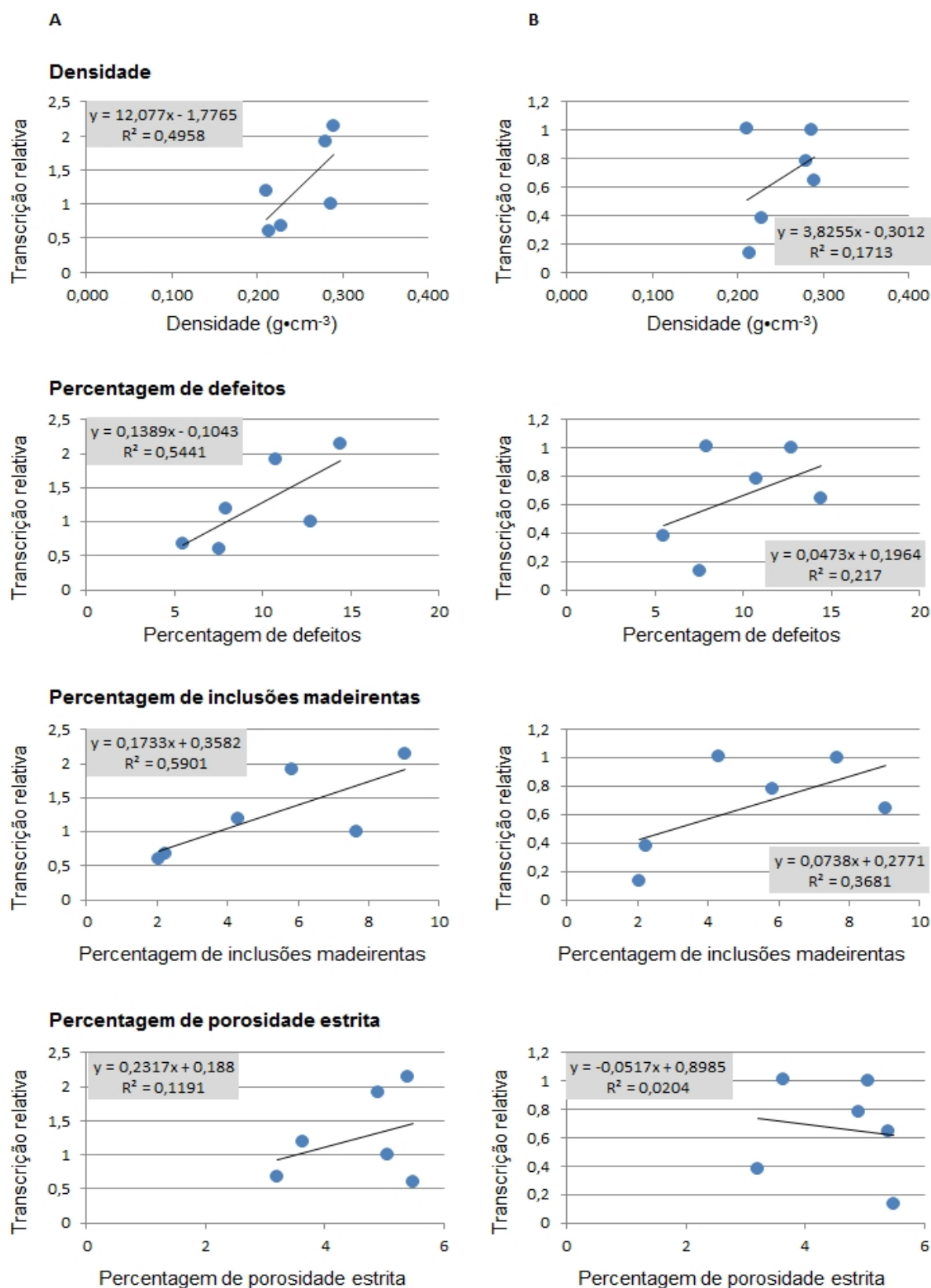


Figura 19: Relação entre a expressão dos genes de interesse e as diferentes análises de qualidade da cortiça. A: Expressão do gene *QsDMAP1*. B: Expressão do gene *QsMET2*.

## **4. Discussão**

### **4.1. Caracterização física da cortiça**

A cortiça é produzida pela actividade do felogénio, um tecido meristemático secundário muito activo entre Abril e Novembro e geralmente sem descontinuidades, onde ocorre grande actividade celular, de modo a produzirem-se novas células. Estas células constituem o tecido de revestimento do sobreiro, que apresenta características físicas e químicas excepcionais. A análise da caracterização física e da qualidade da cortiça assenta sobretudo nas percentagens obtidas pela análise de imagem, referentes à percentagem de inclusões madeirentas, porosidade estrita ou a ambos (percentagem de defeitos) e pelo cálculo da densidade. Estas medições foram realizadas em cortiças colhidas de seis árvores previamente seleccionadas da Herdade dos Leitões (Ponte de Sor, Portalegre). As amostras foram submetidas a uma análise visual preliminar, escolhendo-se 3 árvores produtoras de cortiça de boa qualidade (HL12, HL14 e HL16) e 3 árvores produtoras de cortiça de má qualidade (hl2, hl3 e hl18). Em termos gerais, e em quase todas as análises, foi possível separar dois grupos de amostras. Assim, as amostras de boa qualidade (HL) correspondiam às cortiças com menor densidade e com menor percentagem de defeitos (considerando-se os defeitos gerais e as inclusões madeirentas). Para as amostras de má qualidade (hl), foi observado o oposto, isto é, um maior valor de densidade acompanhado por maiores percentagens de defeitos.

O processo de cozedura efectuado previamente à análise de imagem teve um efeito significativo em todas as amostras, independentemente da sua qualidade. A densidade baixou com este processo e houve simultaneamente um aumento de calibre, devido à hidratação e consequente expansão das paredes celulares (Pereira, 2007). A cozedura das cortiças, que é também o método usado industrialmente, torna-se assim um processo de maior importância pois, se por um lado reduz a densidade, por outro, ao aumentar o calibre, poderá contribuir para um maior rendimento da cortiça durante o processamento industrial. Fica então demonstrado que a cozedura tem um efeito positivo na melhoria da qualidade da cortiça, para além de permitir uma melhoria substancial das propriedades mecânicas da mesma. Em algumas amostras a cozedura não só não levou ao crescimento num dos eixos, como levou mesmo a alguma contracção nos outros (quadro 3). Por exemplo, a amostra HL16 teve um crescimento no eixo transversal, mas uma contracção ao longo do eixo tangencial. Este tipo de contracção poderá dever-se (i) à limitação do espaço do banho onde se realizou a cozedura e consequentemente a uma deficiente hidratação ou (ii) a uma necessidade de contracção da própria cortiça de forma a compensar as forças exercidas. É

ainda de salientar a grande variabilidade intra-árvore, o que acaba por mostrar a elevada variabilidade deste material.

A caracterização da qualidade da cortiça obtida por métodos de análise de imagem pôde ser feita através do cálculo da percentagem geral de defeitos que integra as inclusões madeirentas e a porosidade das amostras de cortiça. A percentagem de inclusões madeirentas foi aquela que representou mais eficazmente a verdadeira qualidade da cortiça e aquela que melhor reflecte as necessidades da indústria deste material, uma vez que é também o tipo de defeitos mais relevante durante o processo industrial (Gonzalez-Andrados & Pereira, 1996). Tal como já descrito por Pereira (2007), as inclusões madeirentas são constituídas por um tecido mais denso do que o tecido suberoso, tendo influência directa na eficaz utilização da cortiça. Simultaneamente, a correlação positiva encontrada entre a densidade e a percentagem de inclusões madeirentas permite concluir que estas inclusões são um dos factores que contribui significativamente para o aumento da densidade deste material.

Ao tentar estabelecer uma correlação entre a porosidade estrita e o calibre das pranchas de cortiça, verificou-se que esta era muito reduzida ( $R^2 = 0,2921$ ), dados que contrariam o trabalho de Fortes *et al.* (2004), onde se associa a quantidade de poros ao calibre da cortiça. Contrariamente ao que seria de esperar, a correlação entre a percentagem de porosidade estrita e a densidade da cortiça, apesar de positiva, é também relativamente baixa ( $R^2 = 0,2622$ ), parecendo resultar do tecido de enchimento que constitui os poros (Graça & Pereira, 2004; Pereira, 2007), uma vez que este tecido, por apresentar diversos espaços intracelulares, não deverá contribuir para um aumento de densidade. Contudo, esta correlação é ainda assim positiva, o que contraria o esperado, dado que os espaços intracelulares do tecido de enchimento deveriam contribuir para uma redução da densidade. Porém, considerando esta percentagem em termos brutos, constatamos facilmente que, por um lado, surge uma tendência para que a cortiça de má qualidade apresente uma maior percentagem de porosidade e, por outro lado, a cortiça de má qualidade é claramente aquela que apresenta uma maior densidade. No entanto, a relação entre a densidade e os poros da cortiça pode estar a ser mascarada por outros factores indirectos e não pela porosidade em si, pois ao submeter-se a cortiça a pesos para ser aplanada, poderia ter havido o colapso de alguns poros sendo assim introduzido um erro experimental que teria afectado a leitura da percentagem de porosidade estrita.



## 4.2. Análise da expressão génica no felogénio

Durante o processo de diferenciação celular do felogénio em cortiça, têm de ser activados diversos mecanismos, de forma a conseguir a programação celular requerida, nomeadamente a programação epigenética, de onde se destaca a metilação do DNA como um dos mais importantes. O envolvimento da metilação do DNA no desenvolvimento normal de plantas é bem conhecido, como foi mostrado por Cao *et al.* (2002a) ao verificarem que o efeito de uma mutação no gene *drm2*, em *Arabidopsis thaliana* conduz a uma expressão anormal do gene *FWA* e, por sua vez, a um fenótipo de floração tardia. O envolvimento da metilação na diferenciação celular, tanto em animais como em plantas, é também bem conhecido (Zhang *et al.* 2010), tornando-se importante conhecer o comportamento dos genes envolvidos na metilação do DNA durante a actividade do felogénio. Para tal, identificaram-se alguns genes associados a cada uma das classes de metiltransferases de DNA (DNMTs) a partir de bibliotecas de ESTs. Os cinco genes escolhidos foram caracterizados e denominados consoante a sua classe e as homologias com genes já conhecidos. Assim, foi estudada a expressão do gene *QsMET1* e *QsMET2* (classe MET – METiltransferases), *QsDRM2* (Classe DRM – Domains Rearranged Methyltransferases), *QsCMT3* (classe CMT – CromoMetilTransferases) e *QsDMAP1* (DnmMt1-Associated Protein 1) que, apesar de não codificar para uma metiltransferase, codifica uma proteína associada. Estas sequências permitiram construir árvores filogenéticas que mostram as relações de semelhança com outras espécies vegetais. Em todos os casos, os genes utilizados neste estudo foram posicionados juntos dos seus homólogos correspondentes a espécies filogeneticamente próximas do sobreiro e encontrando-se sempre em clades de Eudicotiledóneas. Assim, a evolução das metiltransferases de DNA em sobreiro parece espelhar as relações filogenéticas que existem entre as espécies comparadas.

A variação da expressão génica estudada (figura 14) deixa claro que o gene com maior taxa de expressão é o *QsDRM2*. O facto de este ser o único dos cinco genes responsável pela metilação que ocorre em zonas que não estavam previamente metiladas (Sharma *et al.*, 2009) evidencia a estreita ligação da metilação *de novo* e o estabelecimento das marcas epigenéticas associadas à diferenciação celular (Cao *et al.*, 2000).

A análise da estabilidade da expressão génica aponta para uma baixa variação do gene *QsDRM2*. Estudos na palmeira *Elaeis guineensis* (Rival *et al.*, 2008) mostram que a expressão deste gene apresenta também muita estabilidade ao longo do tempo e em diferentes locais da planta. Assim, os resultados apresentados parecem indicar que o processo de metilação *de novo*, do qual esta proteína é responsável, se dá de uma forma estável no felogénio do sobreiro, provavelmente por estar envolvido em processos

fundamentais, como a diferenciação celular. Desta forma, o gene *QsDRM2* parece ser um bom candidato a gene de referência em análises futuras, dada a sua estabilidade.

A estabilidade deste gene não fica muito além da estabilidade do gene *QsCMT3*. A baixa variação destes dois genes parece indicar que não são directamente responsáveis pela produção de boas ou más cortiças, não sendo relevantes, portanto, para a qualidade da mesma. A confirmar esta hipótese está o resultado do agrupamento feito com o resultado da expressão destes genes nas amostras de boa e má qualidade, onde não foi possível agrupar as árvores nos dois *clusters* de interesse (produtoras de cortiça de boa e má qualidade).

Em termos relativos, a expressão dos genes *QsDMP1*, *QsMET1* e *QsMET2* é inferior em árvores produtoras de cortiça de boa qualidade. Estes três genes estão associados à mesma classe de metiltransferases de DNA (MET), seja por pertencerem a ela (no caso dos genes *QsMET1* e *QsMET2*) (Finnegan & Dennis, 1993; Genger *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2010) ou por estarem descritos como associados à sua acção, como no caso do gene *QsDMP1* (Rountree *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2010). Estes resultados parecem indicar que a metilação de manutenção em contextos simétricos e possivelmente a acetilação da cromatina são os tipos de marcas epigenéticas mais relevantes para a qualidade da cortiça. Surpreendentemente, verifica-se uma baixa correlação entre a expressão dos genes *QsDMP1* e *QsMET1*, o que poderá ser explicado pela diversidade de funções da proteína *QsDMP1*. Efectivamente, para além da sua associação directa à *MET1*, uma vez que pode estabelecer uma ligação aos primeiros 120 aminoácidos desta enzima e assim guiá-la para a forquilha de replicação, durante a fase S, coadjuvando-a na metilação do DNA (Rountree *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2010), também se conhece a sua associação a outras proteínas. Assim, por exemplo, estabelece associações com o complexo HAT (Doyon *et al.*, 2004), envolvendo-se na reparação do DNA (Negishi *et al.*, 2009), ou com o complexo HDAC, responsável pela desacetilação das histonas (Rountree *et al.*, 2000). A proteína *QsDMP1* poderá então ser necessária para simultaneamente estar envolvida na metilação do DNA e nos outros processos epigenéticos que ocorrem no felogénio.

Apesar da baixa correlação entre os genes *QsDMP1* e *QsMET1*, os estudos efectuados mostram uma tendência para que, no caso das árvores produtoras de cortiça de boa qualidade, os genes terem uma expressão menor. Mostrou-se ainda uma significativa relação entre a expressão dos genes *QsMET1* e *QsMET2*. No tecido estudado, a actividade de *QsMET1* está bastante reduzida, tendo sido necessário 10 vezes mais cDNA inicial para conseguir estudar a expressão deste gene. Por outro lado, a expressão de *QsMET2* é cerca

de 8x maior, podendo então pensar-se que o gene *QsMET2* está a compensar o baixo nível de expressão do seu parólogo. Assim, poder-se-ia propor que ambos os genes desta classe funcionam em sintonia, isto é, a expressão de um gene poderá compensar a expressão do outro. Efectivamente, Bernacchia *et al.* (1998) mostraram haver, em cenoura, expressão diferencial destes genes, em culturas de células em suspensão e vários tecidos, com ou sem actividade meristemática, onde observaram que a expressão de *MET1* era superior à de *MET2*. No entanto, verificaram ainda que a distribuição espacial dos dois genes variava, pois enquanto *MET1* possuía uma distribuição uniforme nos meristemas, a expressão de *MET2* estava limitada ao meristema apical e aos primórdios foliares jovens. Apesar da expressão relativa dos dois genes em sobreiro ser o oposto ao relatado para cenoura, a distribuição espacial diferencial da expressão dos dois genes leva a supor que há tecidos em que esta relação está invertida, como observado em sobreiro.

Os genes *QsMET2* e *QsDMP1* foram aqueles que estatisticamente permitiam distinguir as árvores produtoras de boa cortiça, em oposição às produtoras de cortiça de má qualidade, apesar do gene *QsDMP1* apresentar sempre uma melhor correlação que *QsMET2*. O gene *QsDMP1* apresenta correlações fortes com todos os parâmetros analisados, excepto com a percentagem de porosidade que, como já foi mostrado, não possui capacidade de avaliar, por si só, correctamente a qualidade da cortiça. Os dados apresentados fazem crer que o gene *QsDMP1* estará envolvido nos processos que conduzem à deterioração da qualidade da cortiça, principalmente no que diz respeito à formação de inclusões madeirentas, uma vez que é com essa percentagem que se obtém a maior correlação ( $R^2 = 0,5901$ ). No entanto, o mecanismo por detrás deste processo é ainda difícil de perceber, uma vez que este gene participa em inúmeros processos do ciclo e diferenciação celulares. Mais importante do que o seu papel de coadjuvante na metilação do DNA, ou mesmo através das alterações da cromatina, o papel do gene *QsDMP1* poderá passar pela sua intervenção ao nível da reparação do DNA. Negishi *et al.* (2009) demonstraram a importância do gene *Dmp1* na reparação do DNA e na manutenção da integridade da cromatina em mamíferos. Assim, porções de células do felogénio deverão morrer e interromper a continuidade do tecido, obrigando à formação de um tecido de cicatrização que levaria ao aparecimento das inclusões madeirentas. Esta morte celular poderá por sua vez originar quebras no DNA, sendo então recrutada a enzima *QsDMP1* para reparar o DNA danificado e evitar assim a proliferação da morte celular nas células próximas.

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

Dos parâmetros estudados para a avaliação da qualidade da cortiça, destaca-se a percentagem de inclusões madeirentas, dado ser aquele que apresenta uma melhor relação com a qualidade. Porém, a medição desta percentagem é demorada, não sendo portanto apropriado para uma avaliação rápida da mesma. O trabalho aqui apresentado conseguiu estabelecer uma boa relação entre as inclusões madeirentas e a densidade da cortiça. Sendo que a densidade da cortiça é um parâmetro muito fácil e rápido de medir, poderá ser uma boa forma de quantificar objectivamente a qualidade da cortiça, com resultados muito ajustados à realidade. A boa relação que se conseguiu estabelecer entre as percentagens de defeitos considerados e a densidade só foi possível dada a análise em separado dos poros e das inclusões madeirentas. A percentagem de porosidade estrita não mostrou correlações significativas com os restantes parâmetros analisados, podendo ser incorrecto basear a análise de qualidade de uma prancha de cortiça nesse parâmetro. Ainda relativamente à porosidade, admite-se um erro experimental no decorrer da preparação das amostras, devido à cozedura e aplanagem das mesmas, dado que alguns poros poderão ter cedido às forças a que foram sujeitos. Estudos futuros poderão focar-se no efeito da metodologia aplicada e avaliar a percentagem de porosidade estrita, numa fase anterior e posterior à cozedura e aplanamento, de forma a conseguir compará-los e esclarecer os efeitos que podem advir desta prática.

A nível genómico, foram caracterizados e descritos cinco genes até então não identificados em sobreiro, estando confirmada, a presença de pelo menos uma metiltransferase de DNA de cada uma das classes conhecidas. Foi ainda confirmada a presença do gene *QsDMP1*, que está descrito como apresentando diversas funções celulares, desde coadjuvar enzimas envolvidas no estabelecimento de diversas marcas epigenéticas, como a MET1 e as HAT, até à reparação do DNA. A análise filogenética efectuada sobre os genes estudados mostra que a evolução destes genes respeitou aquela que parece ter sido a evolução natural das espécies consideradas.

A elevada estabilidade observada na expressão do gene *QsDRM2*, torna-o num bom candidato a gene de referência em futuras análises de expressão génica em felogénio. Este foi também o gene que apresentou maior expressão, prevendo-se portanto uma elevada taxa de metilação *de novo* no felogénio. Sendo o felogénio um tecido merismático, dando origem a células em diferenciação, percebe-se a necessidade deste tipo de metilação de forma a regular a expressão dos genes cuja expressão tem que ser remodelada no novo tecido em formação. A sua estabilidade, observada em amostras produtoras de cortiça de

boa e de má qualidade, faz supor que este gene não deverá ser relevante na formação dos defeitos deste tecido.

A expressão diferencial dos genes *QsMET2* e *QsDMP1*, entre árvores produtoras de boa cortiça e de má cortiça, fazem de ambos bons candidatos a uma análise aprofundada na busca das causas dos defeitos da cortiça. O gene *QsDMP1* é aquele onde a correlação é mais forte, sendo então de esperar que possa estar realmente envolvido na formação de defeitos. No entanto, o envolvimento deste gene não é claro, uma vez que ele poderá ser a causa para o aparecimento de defeitos, ou por outro, a sua expressão pode ser uma consequência da inviabilidade das células do felogénio. Assim, e devido à elevada multiplicidade de funções onde a proteína *QsDMP1* parece estar envolvida, será necessário aprofundar a informação sobre o gene *QsDMP1*, de forma a conhecer quais os processos e em qual das vias ele poderá estar a ser usado no processo de formação da cortiça.

Também a avaliação do envolvimento dos processos apoptóticos no processo de formação de inclusões madeirentas é fundamental para confirmar ou não a via pela qual as células do felogénio morrem, dando origem a inclusões e podendo, a partir daí, ser identificados os motivos que desencadeiam os mecanismos apoptóticos durante o desenvolvimento do tecido vegetal de revestimento que é a periderme.

## 6. Referências

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Orntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64, 5245-5250.
- Bauer, M. J., & Fischer, R. L. (2011). Genome demethylation and imprinting in the endosperm. *Curr Opin Plant Biol* 14, 162-167.
- Berger, S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.
- Bernacchia, G., Primo, A., Giorgetti, L., Pitto, L., & Cella, R. (1998). Carrot DNA-methyltransferase is encoded by two classes of genes with differing patterns of expression. *Plant J* 13, 317-329.
- Borges, F., Gomes, G., Gardner, R., Moreno, N., McCormick, S., Feijo, J. A., & Becker, J. D. (2008). Comparative transcriptomics of Arabidopsis sperm cells. *Plant Physiol* 148, 1168-1181.
- Cao, X., & Jacobsen, S. E. (2002a). Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol* 12, 1138-1144.
- Cao, X., & Jacobsen, S. E. (2002b). Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4, 16491-16498.
- Cao, X., Springer, N. M., Muszynski, M. G., Phillips, R. L., Kaeppler, S., & Jacobsen, S. E. (2000). Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4979-4984.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J. F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36, W465-469.
- Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., & Cote, J. (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol* 24, 1884-1896.
- Finnegan, E. J., & Dennis, E. S. (1993). Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res* 21, 2383-2388.
- Finnegan, E. J., & Kovac, K. A. (2000). Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol* 43, 189-201.

- Finnegan, E. J., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8449-8454.
- Fortes, M. A., Rosa, M. E. & Pereira, H. (2004). *A cortiça*. IST Press, Lisboa.
- Gehring, M., Reik, W., & Henikoff, S. (2008). DNA demethylation by DNA repair. *Trends in Genetics* 25, 82-90.
- Genger, R. K., Kovac, K. A., Dennis, E. S., Peacock, W. J., & Finnegan, E. J. (1999). Multiple DNA methyltransferase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 41, 269-278.
- Goll, M. G., & Bestor, T. H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74, 481-514.
- Gonzalez-Adrados, J. R., & Pereira, H. (1996). Classification of defects in cork planks using image analysis. *Wood Science and Technology* 30, 207-215.
- Graça, J., & Pereira, H. (2004). The periderm development in *Quercus suber*. *IAWA Journal* 25, 325-335.
- Henderson, I. R., & Jacobsen, S. E. (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447, 418-424.
- Holliday, R., & Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187, 226-232.
- Huang, J., Wand, H., Xie, X., Zhang, D., Liu, Y., & GGuo, D. (2010). Roles of DNA methyltransferase in *Arabidopsis* development. *African Journal of Biotechnology* 9, 8506-8514.
- Jones, L., Ratcliff, F., & Baulcombe, D. C. (2001). RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol* 11, 747-757.
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11, 204-220.
- Leal, S., Sousa, V., & Pereira, H. (2006). Within and between-tree variation in the biometry of wood rays and fibres in cork oak (*Quercus suber* L.). 585-597.
- Lindroth, A. M., Cao, X., Jackson, J. P., Zilberman, D., McCallum, C. M., Henikoff, S., & Jacobsen, S. E. (2001). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292, 2077-2080.
- Lindroth, A. M., Shultis, D., Jasencakova, Z., Fuchs, J., Johnson, L., Schubert, D., Patnaik, D., Pradhan, S., Goodrich, J., Schubert, I., et al. (2004). Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *Embo J* 23, 4286-4296.

- Lister, R., O'Malley, R. C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B. D., Berry, C. C., Millar, A. H., & Ecker, J. R. (2008). Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell* 133, 523-536.
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q. M., et al. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322.
- Lumaret, R., Tryphon-Dionnet, M., Michaud, H., Sanuy, A., Ipotesi, E., Born, C., & Mir, C. (2005). Phylogeographical variation of chloroplast DNA in cork oak (*Quercus suber*). *Ann Bot* 96, 853-861.
- Morales-Ruiz, T., Ortega-Galisteo, A. P., Ponferrada-Marin, M. I., Martinez-Macias, M. I., Ariza, R. R., & Roldan-Arjona, T. (2006). DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6853-6858.
- Natividade, J. V. (1950). *Subericultura* (2ª edição). Direcção Geral das Florestas, Lisboa.
- Negishi, M., Chiba, T., Saraya, A., Miyagi, S., & Iwama, A. (2009). Dmap1 plays an essential role in the maintenance of genome integrity through the DNA repair process. *Genes Cells* 14, 1347-1357.
- Pereira, H. (2007). *Cork: Biology, Production and uses*. Elsevier publications, Amsterdão.
- Pereira, H., Lopes, F., & Graça, J. (1996). The evaluation of the quality of cork planks by Image Analysis. *Holzforschung* 50, 111-115.
- Preuss, S. B., Costa-Nunes, P., Tucker, S., Pontes, O., Lawrence, R. J., Mosher, R., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., Baulcombe, D. C., Viegas, W., & Pikaard, C. S. (2008). Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins. *Mol Cell* 32, 673-684.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H., & Moorman, A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339, 62-66.
- Ricardo, C. P., Martins, I., Francisco, R., Sergeant, K., Pinheiro, C., Campos, A., Renaut, J., & Fevereiro, P. (2011). Proteins associated with cork formation in *Quercus suber* L. stem tissues. *J Proteomics* 74, 1266-1278.
- Rival, A., Jaligot, E., Beule, T., & Finnegan, E. J. (2008). Isolation and expression analysis of genes encoding MET, CMT, & DRM methyltransferases in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in relation to the 'mantled' somaclonal variation. *J Exp Bot* 59, 3271-3281.
- Rountree, M. R., Bachman, K. E., & Baylin, S. B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 25, 269-277.



- Şen, A., Quilhó, T., & Pereira, H. (2011). The cellular structure of cork from *Quercus cerris* var. *cerris* bark in a materials' perspective. *Industrial Crops and Products* 34, 929-936.
- Sharma, R., Mohan Singh, R. K., Malik, G., Deveshwar, P., Tyagi, A. K., Kapoor, S., & Kapoor, M. (2009). Rice cytosine DNA methyltransferases - gene expression profiling during reproductive development and abiotic stress. *Febs J* 276, 6301-6311.
- Shin, J. H., Kang, H. C., Park, Y. Y., Ha, D. H., Choi, Y. H., Eum, H. Y., Kang, B. G., Chae, J. H., Shin, I., Lee, J. H., & Kim, C. G. (2010). Corepressor MMTR/DMP1 is an intrinsic negative regulator of CAK kinase to regulate cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* 402, 110-115.
- Soler, M., Serra, O., Molinas, M., García-Berthou, E., Caritat, A., & Figueras, M. (2008). Seasonal variation in transcript abundance in cork tissue analyzed by real time RT-PCR. *Tree Physiology* 28, 743-751.
- Wada, Y. (2005). Physiological functions of plant DNA methyltransferases. *Plant Biotechnology* 22, 71-80.
- Wyatt, G. R. (1951). Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Biochem J* 48, 581-584.
- Youngson, N. A., & Whitelaw, E. (2008). Transgenerational epigenetic effects. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9, 233-257.
- Zhang, M., Xu, C., Yan, H., Zhao, N., von Wettstein, D., & Liu, B. (2009). Limited tissue culture-induced mutations and linked epigenetic modifications in F hybrids of sorghum pure lines are accompanied by increased transcription of DNA methyltransferases and 5-methylcytosine glycosylases. *Plant J* 57, 666-679.

## Anexo I: Sequências utilizadas na análise filogenética

### Sequências para análise da classe MET

Sequência	Espécie	Número de acesso
AtMET1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAA32829
BrMET1a	<i>Brássica rapa</i>	BAF34635
BrMET1b	<i>Brássica rapa</i>	BAF34636
DcMET1	<i>Daucus carota</i>	AAC39355
DcMET2	<i>Daucus carota</i>	AAC39356
EgMET1	<i>Elaeis guineensis</i>	ABW96888
LeMET2	<i>Solanum lycopersicum</i>	CAA05207
NsMET1	<i>Nicotiana sylvestris</i>	CAQ18900
NtMET1	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAF36443
OsMET1 – 1	<i>Oryza sativa</i>	AAP44671
OsMET1 – 2	<i>Oryza sativa</i>	DAA01513
PpMET1	<i>Prunus persica</i>	AAM96952
PsMET	<i>Pisum sativum</i>	AAC49931
QsMET1	<i>Quercus suber</i>	(gene em estudo)
QsMET2	<i>Quercus suber</i>	(gene em estudo)
ZmMET1	<i>Zea mays</i>	AAC16389

### Sequências para análise da classe DRM

Sequência	Espécie	Número de acesso
AtDRM1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_197042
AtDRM2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAF66129
EgDRM	<i>Elaeis guineensis</i>	ABW96890
HvDnmt3-1	<i>Hordeum vulgare</i>	CAJ01711
MtDRML1a	<i>Medicago truncaluta</i>	ABE82825
MtDRML1b	<i>Medicago truncaluta</i>	ABE92108
NsDRM	<i>Nicotiana sylvestris</i>	CAQ18914
NtDRM	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAC67060
NtoDRM	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	CAS84143
OsZmet3	<i>Oryza sativa</i>	AAN61474
QsDRM2	<i>Quercus suber</i>	(gene em estudo)
Zmet3	<i>Zea mays</i>	AAF68537

### Sequências para análise da classe CMT

<b>Sequência</b>	<b>Espécie</b>	<b>Número de acesso</b>
AtCMT3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAK71870
BrCMT	<i>Brássica rapa</i>	BAF34637
EgCMT1	<i>Elaeis guineensis</i>	ABW96889
HvCMT1	<i>Hordeum vulgare</i>	CAJ01708
NsCMT3	<i>Nicotiana sylvestris</i>	CAQ18903
NtCMT3	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAC53936
NtoCMT3	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	CAS84142
OsMET2a	<i>Oryza sativa</i>	NP_912505
QsCMT3	<i>Quercus suber</i>	(gene em estudo)
ZMET2	<i>Zea mays</i>	AAK11516
ZMET5	<i>Zea mays</i>	AAM28227

### Sequências para análise das proteínas associadas à DNMT1

<b>Sequência/Espécie</b>	<b>Número de acesso</b>
<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002880287
<i>Arabidopsis thaliana</i> – 1	NP_850470
<i>Arabidopsis thaliana</i> – 2	AAB63821
<i>Hordeum vulgare</i>	BAK05069
<i>Oryza sativa</i> – 1	NP_001056183
<i>Oryza sativa</i> – 2	EEE64536
<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002320280
<i>Quercus suber</i>	(gene em estudo)
<i>Ricinius communis</i>	XP_002515237
<i>Sorghum bicolor</i>	XP_002451737
<i>Vitis vinífera</i>	XP_002278881
<i>Zea mays</i>	NP_001150819
<i>Glycine max</i>	ACU19179

## Anexo II: Alinhamentos entre os genes de estudo e as referências nas bases de dados

Para cada alinhamento, apresenta-se o gene de estudo como *Query* e o gene de referência como *Sbjct*. Indicam-se a azul os locais de ligação dos primers. A verde destaca-se a sequência amplificada. As setas verdes indicam a totalidade da sequência amplificada.

### Alinhamento das sequências *QsCMT3* (*Query*) e *EgCMT1* (*Sbjct*)

Gene de referência: *Elaeis guineensis* CMT-type DNA-methyltransferase mRNA (EU117217.1)

Score = 251 bits (278), Expect = 3e-70  
Identities = 252/325 (78%), Gaps = 3/325 (1%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query  45      GTAGAAYGGGATCCAGATTGTAGAGAGRGTCATTTGAAGTCAAGGGAAACCCCTTGGTAC  104
          || ||| ||||| ||||| | ||||| || | || || ||||| ||||| |
Sbjct  2467     GTTGAATGGGATCCAGAAATT-GAGAGAGTATTATTACCCTCG-GGGAAACCTTTGGTTC  2524

Query  105     CAGATTATGCAATGAGTTTTGTCAACGGGACGTCATCTAAACCTTTTGCACGTTTATGGT  164
          | || ||||| ||||| || ||||| || | ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct  2525     CTGACTATGCTATGAGTTTCATAAAAGGGAAATCTTTGAAACCTTTGGACGTCATGGT  2584

Query  165     GGGATGAGACTGTGCCAACTGTTGTTACACGAGCTGAGCCTCACAATCAGGCAATTTTAC  224
          ||||| ||||| ||||| || ||||| || ||||| || ||||| ||||| |||||
Sbjct  2585     GGGATGAAACTGTGCCTACAGTTGTAACAAGAGCCGAACCTCACAATCAGGCTTACTAC  2644

Query  225     ATCCAGTACAGAACAGGGTACTCACAATACGTGAGAATGCTAGACTTCAGGGTTTTCTTG  284
          ||||| || | || ||||| |||| ||||| ||||| || ||||| ||||| |||||
Sbjct  2645     ATCCAGAGCAAGATAGAGTACTCTCAATTCGTGAGAATGCACGGCTTCAAGTTTTCTTG  2704

Query  285     RTTGTTACAAGCTTTGTGGTCCAGTAAAGAGAGATACATTCAAGTTGGGAATGCTGTTG  344
          || ||||| ||| ||||| || || ||||| || || || ||||| ||||| |||||
Sbjct  2705     ATTTTACAGACTTCGTGGCCCTGTTAAAGAGCGCTATATACAAGTTGGAAATGCTGTAG  2764

Query  345     CGGTCCTGTTTGCTCGAGC-CTTGG  368
          | || ||||| ||||| || |||||
Sbjct  2765     CTGTACCTGTTGCTCGTGCACCTGG  2789

```

## Alinhamento das sequências *QsDRM2* (Query) e *EgDRM2* (Sbjct)

Gene de referência: *Elaeis guineensis* DRM-type DNA-methyltransferase mRNA, complete cds (EU117218.1)

Score = 255 bits (282), Expect = 1e-71  
Identities = 290/387 (75%), Gaps = 2/387 (1%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query   8      CTCTCAGTCTTGAAAGACATGTTCCAGGAGGTATCAATCTTCTCTCTCTTTTCTCTGGG   67
          ||||| || ||||| || ||||| || || || || || || ||||| || ||
Sbjct  1665    CTCTCTGTATTGAAGGATATGTTCCCAATGGAATAACTGTATTGTCACTTTTTTCGGGT   1724

Query   68      ATAGGTGGTGCAGAAGTAGCCCTACATCGACTTGGTATCCCTTTGAAGAATGTTGTGTCG   127
          || || ||||| || || || || ||||| || || || || || ||||| ||||| ||
Sbjct  1725    ATTGGAGGTGCTGAGGTGGCTCTCCATCGGCTGGGAATACATCTGAAGACTGTTGTTTCT   1784

Query   128     GTTGAGATTTTCAAGAGTAAATAGAAAAATATKKSAGGAGTTGGTGGGAGCAAAACAAACC   187
          ||||| ||||| ||||| ||||| || || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||
Sbjct  1785    GTTGAGATTTTCAAGAGTAAACAGAAAC-ATACTTAAGAGCTGGTGGGAGCAAA-CAAATC   1842

Query   188     AGAAAGGGAATTTGATTGACCTTGCAGATGTGCAGCAGCTAAATGGTGACCGGTTGGAGC   247
          | ||||| | || ||||| ||||| || || || ||||| || || |||||
Sbjct  1843    AAACAGGGGAACATAAGACCTTTTGTATGTACAAGAACTTAATGGTGACAAGCTTGAGC   1902

Query   248     AGTTGATGAACTCATTTGGTGGATTTGATCTTGTAGTTGGTGGGAGCCCATGTAATAATC   307
          || |||| || || ||||| ||||| || || ||||| || ||||| ||||| |||||
Sbjct  1903    AGATGATTAACACATTTGGTGGGTTTGTATCTGGTTATCGGTGGAAGTCCATGCAATAATC   1962

Query   308     TTGCAGGTAGCAACAGGCATCATCGAGATGGACTTGAGGGTAAAGAATCTGCACTCTTCT   367
          || ||||| ||||| || || || ||||| || ||||| || || || || || |||||
Sbjct  1963    TTTCAGGTAGCAACCGGTATAGTCGTGATGGGCTGGAGGGTAAACATTCATCTCTTTTCT   2022

Query   368     ATGATTACTTTTCGTATTCTAGTACTTG   394
          ||||| || || || || || |||||
Sbjct  2023    ATGATTATTTCCGCATCTTAGACCTTG   2049

```

## Alinhamento das sequências *QsMET1* (Query) e *Met1* (Sbjct)

Gene de referência: *Daucus carota* Met1-type cytosine DNA-methyltransferase mRNA, complete cds (AF007807.1)

Score = 535 bits (592), Expect = 3e-155  
Identities = 556/721 (77%), Gaps = 11/721 (2%)  
Strand=Plus/Plus

```
Query 1      GCAAGGCTCTTGCAAGAAGAAGAGTACTGGAAGTACAATGAAACAGAAAAAAGTACAGG 60
          |||||  | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1303    GCAAGATTGTTGCAGGAAGAAGAGTCTGGAAC-CAATGAAGCAGAAAAAAGGC-CGGG 1360

Query 61      GTTCA-GC-CTCCANGTTTCCAGCAAATTCTACATTAATAATGAAGATGAAATTGCT 118
          | ||| || || |  ||| | ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1361    GATCAAGCACTTC----TTCTAACAAATATTACATAAAAATTAATGAGGATGAGATTGCT 1416

Query 119     AATGATTATCCTCTACCTGCTTATTACAAGAACTCCATAGAAGAACTGATGAATTAATA 178
          ||||| ||||| ||||| || ||||| ||||| || ||||| ||||| |||||
Sbjct 1417    AATGACTATCCTCTACCAGCATATTACAAGACAGCTAACCAAGAAACGGATGAATATATA 1476

Query 179     GTTTTTGAAAGTGATACT-ATATGTG--ACACTGATGAACTCCCTCGAAGTATGCTTCAT 235
          ||||| || | | || | || | || ||||| || ||||| ||||| |||||
Sbjct 1477    ATTTTTGATGGCGGTGCTGATGCGTGTATTACTGATGATTTGCCTCGAAGTATGCTTCAT 1536

Query 236     AATTGGTCACCTCTACAACCTCGGACTCAAGGTTAATTTCTTTGGAACCTCTTCCAATGAAA 295
          || |||| || | ||||| ||||| || || ||||| || ||||| ||||| |||||
Sbjct 1537    AACTGGGCATTGTACAACCTCTGACTCGAGGCTCATTTCTTGGAGCTCCTTCCAATGAAA 1596

Query 296     CCATGTTTCAGATATTGATGTCACTATTTTTGGGTCGGGAGTTATGACTGCTGATGATGGA 355
          ||| | ||||| ||||| ||||| || || || ||||| ||||| |||||
Sbjct 1597    GGGTGTGCTGATATTGATGTCACTATATTTGGATCAGGGGTGATGACTGAGGATGATGGA 1656

Query 356     AGTGGATTCTGTCTTGAAACCGATCCTAATCAGTCTTCTGCGTGTGGCTCAGTAACACAA 415
          | ||||| ||||| || || | || ||||| || ||||| || |||||
Sbjct 1657    ACTGGATTCAATCTTGATGGTGACAGCTCTCAATCTTCTCAGCTGGATTGGGGACAGCA 1716

Query 416     GATGCTGATGGCATTCCAATTTATTTAATTTCCATAAAGGAATGGATGATTGAATTTGGT 475
          || ||||| || ||||| || || || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1717    AATGTTGATGGGATCCCAATATACCTGAGTGCTATAAAGGAATGGATGATTGAATTTGGA 1776

Query 476     TCATCAATGGTTTTTCATTTCAATCCGTA 535
          || ||||| ||||| || ||||| || || || ||||| ||||| |||||
Sbjct 1777    TCCTCAATGGTTTTTATATCAATTCGCACAGATATGGCCTGGTATAGGCTTGGTAAGCCA 1836

Query 536     TCAAAGCAGTATGCTTCATGGTATGAACCGGTTTGAAGACAGCCAGGCTTGCAATAAGT 595
          ||||| ||||| || ||||| ||||| || || || ||||| || || |||||
Sbjct 1837    TCAAAACAGTATGCATCGTGGTATGAACAGTTCTTAAACGGCCAGGGTCGCTATAAGT 1896

Query 596     ATCATCACATTGTTGAAGGAGCAGAGCCGAGTTGCACGGCTTTCTTTTGCAGATGTTGTC 655
          || || ||||| || ||||| || || || ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1897    ATTATTACATTATTAAAGGAGCAGGCCAGGGTTTCTCGTCTTTCTTTTATGGATGTCATT 1956

Query 656     AAAAGAGTTTCAGAGTTCAAGAAGGATCATTGTGCATACATTTCTTCTGATCCAGCAGTT 715
          ||||| ||||| ||||| | |||| |||| || ||||| || ||||| |||||
Sbjct 1957    AAAAGAGTTTCGAGTTTGAAAAGGGTCATCTGCTTACATATCATCTGTTCCGGCAGCT 2016

Query 716     G 716
          |
Sbjct 2017    G 2017
```

## Alinhamento das sequências *QsMET2* (Query) e *DNA-methyltransferase-2* (Sbjct)

Gene de referência: *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata* DNA methyltransferase-2 (DNMT2), mRNA (XM\_002874219.1)

Score = 251 bits (278), Expect = 3e-70  
Identities = 254/330 (77%), Gaps = 1/330 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```
Query 807 GTTCATTAAGCTTGATAGAGCGGTGGGGAAGTGCTATGGATATTGTTTATCCTCGRTTC 866
      || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 854 GTACCAGTAAGTTTGATAGAGAGATGGGGAAACGCAATGGATATTGTTTACCCT-GATTC 912

      -->
Query 867 AAAGCGTTGCTGTTGTTTTACTAAAAGTTATTATCGGTATGTGAAGGGGACTGGCTCACT 926
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 913 AAAGAGATGTTGTTGTTTCACAAAGAGTTATTATCGATACGTGAAGGGCACTGGTTCCCT 972

Query 927 TTTGGCTACTGTCCAGCCAAAGAAGAAAGGCAAGTCATCCCCATTGAAAGAGCGGTGTCT 986
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 973 ATTGGCAACTGTCCAGCCAAAATCAAGGGTAAGGAATCTTGTGTTGAAGGAGCAGCGGCT 1032

Query 987 TAGATTTTTTACTCCTAGGGAGGTTGCTAATCTACATTCTTTCCGGAAGATTTTCACTT 1046
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1033 TAGATACTTCACCCCAAGAGAGGTAGCTAACTTTCACCTCATTCCCTGAAGATTTTGTGTT 1092

Query 1047 CCCACAACAGATAAGCCTTAGACAACGGTATGCATTGTTGGGTAACAGTTTAAGTATAGC 1106
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1093 CCCGAAGCACATAAGCCTTCGACAGAGATATGCAATGCTTGGAACAGTTTAAGTGTAGC 1152

      <--
Query 1107 AGTGGTTGCTCCCTTACTCCGATATCTATT 1136
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1153 AGTCGTGGCTCCTCTGCTTCGGTATCTATT 1182
```

Gene de referência: *Ricinus communis* DNA methyltransferase 1-associated protein, putative, mRNA (XM\_002515191.1)

Query	8	TCAGCATATGAGCTTAAATTCACGAAAAGATGAACCTTCTGCCTCCTTATATTGCAACTG	67
Sbjct	1166	TCAGTATATGAGCCT---TC-ACGAAAAGAAGAACCTTCTGCCTCTTTATATTGCAACTT	1111
Query	68	TTTCTGAAGATTCAAGCAGAGTCAATATTTCTTTCTTAATTCGAGATGCTCTGCACAAAC	127
Sbjct	1110	CTTTTGAAGATTCAAGCAGAGTCAATATTTCTTTCTTAATTCGAGATGCTCTGCACAAAC	1051
Query	128	TGATTTGGTTGGAAGCTCTTGGTTTTAAATTGACCCCAAGTCTTGTAAGTTTGCTCAAC	187
Sbjct	1050	AGCTTTGGTTGGCACTCTTGGTTTTCAAATTGACCCCAAGATCTTGCAATGTTTGCTCAAC	991
Query	188	CYGCTTTATTGTCCGAAGTCCAGCAGATGAGCTTGAGCTTGACCACTTTGGTCAAGTGC	247
Sbjct	990	TCGCTTGATTGTCCGAAGTCTGCAGACGAACTAGCAGCTTGACCACTTTGCTCAAGTGC	931
Query	248	ATATGTTCTCAAATACACTCGAAGCATGCGAAGAGAAGCTAGAGTAGAGGCATTGYCCGC	307
Sbjct	930	ATAAGTTCTCAAATATACACGAAGCATCCGAGAGAAGCTAGAGTAGAGGCATTTTCTGC	871
Query	308	TGTTAATG---CTGAAGATGCAATTGTTGCAGAGGGAAGCTGAACATTGGATGAAGGTGA	364
Sbjct	870	CATTCTGAAGCTGAAGGTCCAAGTATGCAGAGGCAAGCTGAGTATTGGATGAAGGTGA	811
Query	365	TACAGTATACCCGGAAGCTAGCTCTCTCAGCACTTTCTGGACCAGCATTGATGGGAC	424
Sbjct	810	TACGGTATCATCAAGATTAGTAGGCGCCTCAGCAATTTCTGGT---GCATTGATGCTAC	754
Query	425	AGGCAACTCAGACTCTTCAGCTACCTTTGCAGCCATCCGTGACTCAGTTATTCTTTTGC	484
Sbjct	753	AGCCAATACAGATTCTTCAGCACCTTAGTAGCCGCGCGTGACTCATTTATTCTTTTAGC	694
Query	485	TTCAGCAAGAACCTCAGCATCTTTTCGCTCTTGATTGTTTTGTTTGCAGAGGACCATGG	544
Sbjct	693	CTCAGCAAGAACCTCAGCATCTTTTCGCTCTTGCT-GCTTTGTCTGCGAAAGGAACATGG	635
		-->	
Query	545	ATAATGCTCGTTTGCGTTCTATCTCTTGTTGAAACATTGTAAGGTTTCCTTAACAAGAGGGT	604
Sbjct	634	ACAATGCACGCTTGCGCTCTGTCTCTTGTTGAAATGTTGTATGGTTTCCTTGACAAGAGGGT	575
Query	605	TCCCAGAAATGCCTCCAAGAGCTGGAGCTCTAGCAGCCACTATGGCTCGACAAACACTGT	664
Sbjct	574	GTCCTGAAACATCCCCTGGAGATGGAGCTCTAGCAACCAATATAGCTCGAGAAACACTAT	515
Query	665	AATAACGATCCTTCAATTCCCTCCACGGTCCGAGATGATGAGAACCTGTCTAGTCTATCACA	724
Sbjct	514	AATAGCGATCCTTCAATTCCCTCTAAAGACCGAGAGGATGAAAATCTGTCTAG-CTATAACG	456
Query	725	ATAAAGCGGARATCAAATCGTTGGCACAAGTCAAACAACCTGATCTGTCTCCTCCTTGGTTC	784
Sbjct	455	ACGAAGCGGAGATCAAACCTTTACATAAATCAAACAATTGATCTGTCTCTCCTTGGTTC	396
Query	785	CATCCAGGATCATTCAAGTACTTCTCATACTCCTCATCTGTGTAATTTGACAATGTCAACA	844
Sbjct	395	CACATAGGATCAGTCAAATACTTCTCGTACTCTTCTTCGGTATACTTGACAACATCAACT	336



Query	845	GACTTGT	TATACTTGGCAAAGGAATAGTCACGTGTTGGTGGAAACACCATT	TACAACCCTG	904
Sbjct	335	GACTTGT	TATACTTGGCAAATGAATAATCACCTGTTGGTGGAAACACCATT	CACAAC	276
			<--		
Query	905	ACCCAGT	GATAAAGCTGCAAAGTATCTTTTCGAGCAGAATTTGTAAAAGGAAGCCACTGC		964
Sbjct	275	ACCCAATGGT	AAGTTGCAAATTATCTTTCTAGCAGAACTCGTAAAAGGAAGCCATTGC		216
Query	965	CAAGTGATCTTCTCGTCCTTTGGTGGCTGCTTTTTCAATTGAGTCGAATCGATCGGGGC			1024
Sbjct	215	CATGTAATCTTTTCATCTGATGGGGT	CGTTTTTTCAATTGACTAGTATCAATTGAAGGC		156
Query	1025	ATTAGAGGCGCCAAACCACCCGTAAGTGCATACCTCACGAGAAATGCCATCGGGCTTT			1084
Sbjct	155	ATAAGAGGTGCCAATCCACCAGTAAGTGCATACCTCGCGGGAAATGCCATCAGGTTTT			96
Query	1085	CGCTGAGAGTC	1095		
Sbjct	95	CTTTGTGAGTC	85		